

IDENTIFICATION OF NUCLEOTIDE SEQUENCE SPECIFIC TO MYCOBACTERIUM AND DEVELOPMENT OF DIFFERENTIAL DIAGNOSIS STRATEGY FOR MYCOBACTERIAL SPECIES

Publication number: JP2002238563

Publication date: 2002-08-27

Inventor: GALA JEAN-LUC; PASCAL VANNUFFURU

Applicant: UNIV LOUVAIN

Classification:

- International: G01N33/53; C12M1/00; C12N15/09; C12Q1/68;
G01N33/566; G01N33/569; C12R1/32; G01N33/53;
C12M1/00; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/566;
G01N33/569; (IPC1-7): C12N15/09; C12M1/00;
C12Q1/68; G01N33/53; G01N33/566; G01N33/569;
C12N15/09; C12R1/32; C12Q1/68; C12R1/32

- european:

Application number: JP20010024023 20010131

Priority number(s): JP20010024023 20010131

Report a data error here

Abstract of JP2002238563

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for detecting non-tuberculous Mycobacterium strains (NTM) in a sample. SOLUTION: This method comprises the steps of (i) providing a non-tuberculous Mycobacterium species-specific upstream p34 gene region (us-p34) nucleotide probe, (ii) reacting the us-p34 nucleotide probe with the above sample under conditions that allow for the selective formation of nucleotide duplexes between the us-p34 nucleotide probe and the corresponding non-tuberculous Mycobacterium nucleic acid target present in the sample, and (iii) detecting any nucleotide duplexes containing the p34 nucleotide probe.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-238563
(P2002-238563A)

(43) 公開日 平成14年8月27日 (2002.8.27)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/53		33/566	
		33/569	F
審査請求 未請求 請求項の数18 O L 外国語出願 (全 65 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-24023(P2001-24023)

(22) 出願日 平成13年1月31日 (2001.1.31)

特許法第30条第1項適用申請有り 2000年7月31日 発行の「Journal of Clinical Microbiology 第38巻8号 2000年8月号」に発表

(71) 出願人 501045098

ユニヴェルシテ・カトリック・ドゥ・ルーヴァン

UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN

ベルギー、ペー-1348ルーヴァン-ラーヌーヴ、ブラス・ドゥ・リュニヴェルシテ1番

(72) 発明者 ジャン-リュック・ガラ

ベルギー、ペー-1932シント・ステフェンス・ウォルウェ、コントリラン24番

(74) 代理人 100062144

弁理士 青山 稔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイコバクテリア特異的ヌクレオチド配列の同定およびマイコバクテリア種の鑑別診断法の開発

(57) 【要約】

【課題】 試料中の非結核菌マイコバクテリア株 (NTM) を検出する方法を提供すること。

【解決手段】 (i) 非結核菌マイコバクテリア種特異的上流 p 3 4 遺伝子領域 (u s - p 3 4) ヌクレオチドプローブを提供し、(i i) 当該 p - 3 4 ヌクレオチドプローブと当該試料中に存在する対応する非結核菌マイコバクテリア核酸標的間にヌクレオチド二重らせんを選択的に生成させる条件下で当該 u s - p 3 4 を当該試料と反応させ、そして、(i i i) 当該 p - 3 4 ヌクレオチドプローブを含有する全てのヌクレオチド二重らせんを検出する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 非結核菌マイコバクテリア株(NTM)検出法であり、

(i)非結核菌マイコバクテリア種特異的上流p34遺伝子領域(us-p34)ヌクレオチドプローブを提供し、
(ii)当該p-34ヌクレオチドプローブと当該試料中に存在する対応する非結核菌マイコバクテリア核酸標的間にヌクレオチド二重らせんを選択的に生成させる条件下で当該us-p34を当該試料と反応させ、そして、
(iii)当該p-34ヌクレオチドプローブを含有する全てのヌクレオチド二重らせんを検出することより成る方法。

【請求項2】 当該非結核菌マイコバクテリア種特異的us-p34ヌクレオチドプローブが図3より選択された配列、もしくはその相補体、もしくはTがUに置換された対応する配列の少なくとも一部と特異的にハイブリダイズする、請求項1に従う方法。

【請求項3】 当該非結核菌マイコバクテリア種特異的us-p34ヌクレオチドプローブが図3に表される配列、もしくはその相補体、もしくはTがUに置換された対応する配列のグループから選択される、請求項1もしくは2に従う方法。

【請求項4】 試料中のマイコバクテリアの鑑別検出法であり、

(i)少なくとも2種類の異なる非結核菌マイコバクテリア種特異的us-p34ヌクレオチドプローブを提供し、

(ii)当該p-34ヌクレオチドプローブと当該試料中に存在する非結核菌マイコバクテリア核酸間にヌクレオチド二重らせんを選択的に生成させる条件下で当該us-p34を当該試料と反応させ、

(iii)当該p-34ヌクレオチドプローブを含有する全てのヌクレオチド二重らせんを検出し、そして、

(v)生成したヌクレオチド二重らせんより特異的非結核菌マイコバクテリア種の存在と同定を推測することより成る方法。

【請求項5】 試料中の非結核菌マイコバクテリア株の検出法であり、

(i)少なくとも2種類の異なる非結核菌マイコバクテリア種特異的us-p34プライマーを提供し、

(ii)当該試料中に存在する非結核菌マイコバクテリア核酸中のus-p34配列の選択的増幅を許容する条件下で当該us-p34プライマーを当該試料と反応させ、そして、

(iv)ステップ(ii)の増幅生成物を検出することより成る方法。

【請求項6】 試料中のマイコバクテリアの鑑別診断法であり、

(i)図2に示す如く表1もしくは2より選択された少なくとも1個のセンスおよびアンチセンスus-p34プ

ライマーを提供し、

(ii)当該試料に存在する非結核菌マイコバクテリア核酸のus-p34配列の選択的増幅を許容する条件下で当該us-p34プライマーを当該試料と反応させ、

(iii)ステップ(ii)の増幅生成物を検出し、そして、

(iv)生成した増幅物から特異的NTMの存在および同定を推測することより成る方法。

【請求項7】 試料中のMACコンプレックスに属するマイコバクテリア株の検出法であり、

(i)図2に示す如く表1もしくは2より選択された少なくとも1個のセンスおよびアンチセンスus-p34プライマーを提供し、

(ii)当該us-p34プライマーと当該試料中のMACコンプレックスマイコバクテリアの核酸標的の間におけるヌクレオチド二重らせんの選択的生成を許容する条件下で当該us-p34プライマーを当該試料と反応させ、

(iv)当該試料中の当該MACコンプレックスに属するマイコバクテリア核酸のus-p34配列を決定することより成る方法。

【請求項8】 試料中のMOTT マイコバクテリア株の検出法であり、

(i)図2に示す如く表1もしくは2より選択される少なくとも1個のセンスおよびアンチセンスus-p34プライマーを提供し、

(ii)当該us-p34ヌクレオチドプライマーと当該試料中のMOTT マイコバクテリア核酸標的間でヌクレオチド二重らせんの選択的生成を許容する条件下で当該us-p34プライマーを当該試料と反応させ、

(iv)当該試料中のMOTT マイコバクテリア核酸のus-p34配列を決定することより成る方法。

【請求項9】 試料中の新規us-p34配列決定法であり、

(i)図2に示す如く表1もしくは2より選択される少なくとも1個のセンスおよびアンチセンスus-p34プライマーを提供し、

(iv)当該試料中のマイコバクテリア核酸標的中のus-p34配列の増幅を許容する条件下で当該us-p34プライマーを当該試料と反応させ、

(v)(ii)で得られた増幅生成物の配列を決定することより成る方法。

【請求項10】 試料中のマイコバクテリアの鑑別検出法であり、

(vi)図2に示す如く表1もしくは2より選択された少なくとも1個のセンスおよびアンチセンスus-p34プライマーを提供し、

(vii)当該試料に存在する非結核菌マイコバクテリア核酸中のus-p34配列の選択的増幅を許容する条件下で当該us-p34プライマーを当該試料と反応さ

せ、

(viii)(ii)で得られた増幅生成物を図3に表される配列のグループから選択された少なくとも1個の非結核菌マイコバクテリア種特異的u s - p 3 4ヌクレオチドプローブと選択的にハイブリダイズさせ、

(ix)当該u s - p 3 4ヌクレオチド配列を含有する全てのヌクレオチド二重らせんを検出し、

(x)生成したヌクレオチド二重らせんより特定の非結核菌マイコバクテリア株の存在を推測することより成る方法。

【請求項11】 図3に表された核酸配列の1個からの少なくとも8個の連続したヌクレオチド、もしくはその相補体、もしくはTがUで置換された対応する配列より成る、非結核菌マイコバクテリア種特異的u s - p 3 4ヌクレオチドプローブもしくはプライマー。

【請求項12】 表1もしくは2より選択された請求項11の非結核菌マイコバクテリア種特異的u s - p 3 4ヌクレオチドプライマー。

【請求項13】 表3より選択された請求項11の非結核菌マイコバクテリア種特異的u s - p 3 4ヌクレオチドプローブ。

【請求項14】 図3より選択された配列より成る核酸。

【請求項15】 請求項11から14のいずれかに従う少なくとも1個のヌクレオチドプローブ、プライマーもしくは配列より成る組成物。

【請求項16】 請求項11から14のいずれかに従うプローブ、プライマーもしくは配列、もしくは請求項15に従う組成物より成る診断キット。

【請求項17】 表3より選択された少なくとも2個の捕捉プローブを当該担体に固定することより成る、マイコバクテリア検出用固相担体。

【請求項18】 請求項1から4もしくは10のいずれかの方法に使用する、請求項16に従う固相担体。

【発明の詳細な説明】

【0001】(技術分野)本発明は新規遺伝子配列、診断および/もしくは定量法ならびに当該配列を用いた種々のタイプのマイコバクテリア種の同定のための装置に関する。

【0002】(背景技術)マイコバクテリア性疾患は3種のカテゴリーに分類することができる：即ちいずれも結核菌群(TUB)に属する*M. tuberculosis*もしくは*M. bovis*により引き起こされる結核、*M. leprae*により引き起こされるハンセン病、および結核及びハンセン病以外の全てのマイコバクテリア性疾患を引き起こす非結核菌性マイコプラズマ(NTM)により引き起こされる諸疾患である。歴史的には、結核とハンセン病が最も圧倒的に多い二種のマイコバクテリア性疾患である。しかしながら、近年では、一部は後天性免疫不全症候群(AIDS)の発症のために先進諸国においてNTMがより高頻度になっ

てきている(1)。結核は、ヒトおよび動物のみに発症し、今日まで他の保有体は見出されていない。逆に、NTM疾患の原因となるマイコバクテリアの保有体は主として自然環境にあり、これらマイコバクテリアの大多数は既知の抗マイコバクテリア剤に対して生来抵抗性であるため、その根絶は不可能である。迅速かつ特異的な方法によるマイコバクテリア種の同定が今必須とされている。特に、ヒトおよび動物偏性病原性マイコバクテリア(例えば、結核菌群、*M. paratuberculosis*、*M. leprae*など)を潜在的病原性マイコバクテリア(例えば、*M. avium-complex*；*M. chelonae*、*M. kansasii*、*M. xenopi*、*M. simiae*、*M. malmoense*など)および通常非病原性種(例えば、*M. gordonae*；*M. terrae*；*M. nonchromogenicum*；*M. flavescens*；*M. gastri*；*M. smegmatis*など)から迅速鑑別する必要がある。偏性病原菌を除けば、大部分のマイコバクテリアは、自然界のあらゆる場所(土壌、淡水および海水)に実際見出すことができ、摂取もしくは吸入後ヒト気道もしくは消化管に一時的もしくは永続的にコロニーを作ることができる。

【0003】(分類)

a)結核菌群(TUB)のメンバー：

—このグループは、*M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. africanum*、*M. microti*より成る。

b)非結核性マイコバクテリア(NTM)：

—*M. avium-complex*(MAC群)のメンバーは、*M. avium*および*M. intracellulare*に類似するかもしくはこれらの種に共通の中間的特徴を有する数種の環境種(*M. avium*；*M. intracellulare*；*M. paratuberculosis*、*M. scrofulaceum*)を含む。

—TUB以外のマイコバクテリア(MOTTとも呼称される)であってMAC群に所属しないもの(例えば、*M. malmoense*、*M. sulzgai*、*M. kansasii*、*M. xenopi*、*M. chelonae*、*M. simiae*、*M. marinum*、*M. gordonae*、*M. fortuitum*など)。

【0004】(序文)結核菌は世界人口の3分の1に感染し毎年300万人を超える人々を殺している。結核菌群(TUB)のマイコバクテリアによって引き起こされる結核は今も世界の大部分で非常に流行しており、またそれが稀になっている国々に導入され更にその中で伝播する可能性がある(2)。事実、結核は、AIDSおよび移動する労働者、移民、およびホームレスの人々の数の増加に特徴づけられる変化する人口動態の結果として、近年多くの先進工業国で再発生している(3)。特に憂慮されるのは薬剤耐性種の拡散である(4)。全ての第一線抗結核薬に抵抗性のTUB種による罹患の増加のため結核の症例は次第に治療が困難になっている。HIV-1感染患者では、TUBは最もよく見られる日和見細菌感染である。AIDSが進行した段階では、*M. avium-intracellulare complex*(MAC)のメンバーによるマイコバクテリア感染が最も普遍的な全身性細菌性日和見感染であ

る(1)。更に、新生児、幼児、および免疫の抑制された人々に見られる低下したおよび無防備の免疫機能は、*M. avium-intracellulare*、*M. chelonae*、*M. fortuitum*、*M. kansaii*、*M. xenopi*、*M. marinum*、*M. ulcerans*、*M. scrofulaceum*および*M. szulgai*を含む*M. tuberculosis*以外のマイコバクテリア(NTM)による日和見感染を許す。

【0005】増加する数のマイコバクテリアの感染は、マイコバクテリアを種のレベルで迅速に同定することを臨床重要にしている。病原性種を非病原性種と区別して診断することは、疫学的な意味を持つのみならず患者の管理の要求にも合致する。接触感染を起しやすい人は、疾患の拡散を防ぐために隔離したほうがよいであろう。事実、遭遇する種によっては抗生物質による治療は異なる。非結核菌性感染は、*M. tuberculosis*の場合のように届出制度がないため、現在その数を推定するのは困難である。軽症の場合には、更なる試験法がないことや*M. tuberculosis*と間違っただけで診断されたりするため、現在報告されているこれらの種の発症率は事実より低く見積もられていると思われる。NTM性疾患数は過少評価されていると思われるにも拘わらず、増加する数の臨床分離NTM菌が、同定のために臨床検査室に送られてくる。このことは、日和見マイコバクテリア性疾患(特にAIDSとの関連において)の罹患率の増加を反映するか、もしくは結核に対する意識が高まったために培養試験用に提出される試料の数と種類の増加をまた反映しているのであろう。

【0006】これらのマイコバクテリア性疾患を早い段階で検出し同定することができれば、罹患率および死亡率を減少させまた社会経済上の影響を低減させる可能性がある。確定診断の「黄金律」は、マイコバクテリアの培養と表現型試験(例えば、脂肪酸およびミコール酸含量の分析)の組み合わせであることに今も変わっていない。しかしながら、ヒト試料の従来法による培養は最高8ヶ月を要する(マイコバクテリアの種類によって異なる)。例えば、*M. ulcerans*の至適条件下での初代培養は数ヶ月を要するであろう(5)。

【0007】分子生物学的技法に基づく他の方法は、いくつかのマイコバクテリア種の同定のための遺伝子検査の開発を可能にしている。過去10年間に、制限断片長多型(RFRP)分析、オリゴタイピングおよび核酸プローブの使用が感染因子の検出および確定診断の手段として提唱されている(6)。これらの試験法は、従来の培養法に比べて高度に特異的かつ迅速であり、幅広い種類の病原菌、特にマイコバクテリアのような偏好性微生物に適用されてきている。今日までに、分子試験のデザインはこの偏好性属の診断のスピードアップをしてきたが、まだいくつかの欠点を有している。種の同定のためには、16SrRNA遺伝子の高度多型性領域が種特異的多型を含んでいることが示されている。この領域が現在

いくつかの市販のアクセシで用いられており、試料に直接(Accu-Probe; Gen-Probe)もしくは感度を上げるために標的を酵素的に増幅後(AMTD; Gen-Probe; Amplicor MTB、Roche)適用する。しかしながら、これらの市販キットの殆どは、最も一般的な病原性マイコバクテリア種、即ち、*M. tuberculosis*およびMAC株の診断のためにデザインされており、また各々のキットは、各試験につきただ1種類のみのマイコバクテリアを同定するようにデザインされているため、非常に高価でありかつマイコバクテリア種同定の限定的方法でしかない。

【0008】本発明に記載する新しく同定され特徴付けられた配列は鑑別診断法のデザインを可能とするものである。これらの診断方法は、1回のアクセシでTUBおよびNTMを含む広範囲のマイコバクテリア種を同定することができる。加えて、NTM群内においてMAC群のメンバー間の鑑別も可能である。更に、これらの分子標的は臨床試料におけるマイコバクテリア株の定量に新しい展望を開くものである。

【0009】(発明の目的)本発明は、その上流p34(us-p34)決定基により、種々のマイコバクテリア種の同定および/もしくは定量の改善のために、新しい遺伝子配列、方法および装置を提供し、そしてこれらは、迅速な分子スクリーニングにより、それらの疫学的研究ならびにヒト臨床、動物および/もしくは環境試料中における迅速な特徴づけを可能とするものである。

【0010】本発明のもう一つの目的は、既知およびいまだ未知のマイコバクテリア種中に存在する類似の遺伝子配列を同定することである。

【0011】(発明の詳細な説明)本発明はより具体的には、非結核菌マイコバクテリア種(NTM)を検出する方法に関するものであり、(i)非結核菌マイコバクテリア種特異的上流p34遺伝子領域(us-p34)ヌクレオチドプローブを提供し、(ii)当該p34ヌクレオチドプローブと当該試料中に存在する対応する非結核菌マイコバクテリア核酸標的間にヌクレオチド二重らせんを選択的に生成させる条件下で当該us-p34を当該試料と反応させ、そして、(iii)当該p34ヌクレオチドプローブを含有する全てのヌクレオチド二重らせんを検出することより成る。当該プローブは、図3に開示するごとく、当業者により図8にアラインメントされた種特異的us-p34遺伝子領域の配列の全部もしくは一部のみより成っていてもよい。このようなアラインメント(図8)に基づけば、当該法において使用するべき適切なプローブを実際にデザインすることは当業者の知識の範囲内である。

【0012】本発明はより具体的には、当該非結核菌マイコバクテリア種特異的us-p34ヌクレオチドプローブが図3より選択された配列、もしくはその相補鎖、もしくはTがUで置換された対応する配列の少なくとも一部と特異的にハイブリダイズする、上述の方法に関す

る。

【0013】本発明はより具体的には、当該非結核菌マイコバクテリア種特異的us-p34ヌクレオチドプローブが図3に表される配列、もしくはその相補鎖、もしくはTがUで置換された対応する配列のグループより選択される、上述の方法に関する。

【0014】本発明は更に、(i)少なくとも2種類の異なる非結核菌マイコバクテリア種特異的us-p34ヌクレオチドプローブを提供し、(ii)当該p-34ヌクレオチドプローブと当該試料中に存在する非結核菌マイコバクテリア核酸間にヌクレオチド二重らせんを選択的に生成させる条件下で当該us-p34を当該試料と反応させ、(iii)当該us-p34ヌクレオチドプローブを含有する全てのヌクレオチド二重らせんを検出し、そして、(iv)生成したヌクレオチド二重らせんより特異的非結核菌マイコバクテリア種の存在と同定を推測することより成る、試料中のマイコバクテリアの鑑別検出法に関する。

【0015】本発明に従う当該プローブは好ましくは表3より選択される。

【0016】本発明は更に、(i)少なくとも2種類の異なる非結核菌マイコバクテリア種特異的us-p34プライマーを提供し、(ii)当該試料中に存在する非結核菌マイコバクテリア核酸中のus-p34配列の選択的増幅を許容する条件下で当該us-p34プライマーを当該試料と反応させ、そして、(iii)ステップ(ii)の増幅生成物を検出することより成る、試料中の非結核菌マイコバクテリア株の検出法に関する。

【0017】NTM特異的us-p34プライマーは特定の種類に存在し他には存在しないus-p34配列(図3に示す配列の一部)に由来する。図3に与えられる配列のアラインメントに基づけば(図8参照)、マイコバクテリアの特定の種類(タイプ)を選択的に増幅する実際のプライマー配列をデザインすることは当業者の知識の範囲内である。

【0018】本発明は更に、(i)図2に示す如く表1もしくは2より選択された少なくとも1個のセンスおよびアンチセンスus-p34プライマーを提供し、(ii)当該試料中に存在する非結核菌マイコバクテリア核酸のus-p34配列の選択的増幅を許容する条件下で当該us-p34プライマーを当該試料と反応させ、(iii)ステップ(ii)の増幅生成物を検出し、そして、(iv)生成した増幅物から特異的NTMの存在および同定を推測することより成る、試料中のマイコバクテリアの鑑別診断法に関する。図2にステップ(ii)で生成し得る異なる増幅生成物を示す。

【0019】本発明は更に、(i)図2に示す如く表1もしくは2より選択された少なくとも1個のセンスおよびアンチセンスus-p34プライマーを提供し、(ii)当該us-p34プライマーと当該試料中のMACコン

プレックスマイコバクテリア株の核酸標的の間におけるヌクレオチド二重らせんの選択的生成を許容する条件下で当該us-p34プライマーを当該試料と反応させ、(iii)当該試料中の当該MACコンプレックスに属するマイコバクテリア株核酸のus-p34配列を決定することより成る、試料中のMACコンプレックスに属するマイコバクテリア株の検出法に関する。

【0020】「us-p34配列を決定する」という表現は、例えば、直接配列決定により当該特異的MACコンプレックスのus-p34配列の存在を確認することを意味する。他の方法として質量分析法、キャピラリー電気泳動法、もしくはHPLCを用いることができる。

【0021】本発明はまた、(i)図2に示す如く表1もしくは2より選択される少なくとも1個のセンスおよびアンチセンスus-p34プライマーを提供し、(ii)当該us-p34ヌクレオチドプライマーと当該試料中のMOTTマイコバクテリア核酸標的の間でヌクレオチド二重らせんの選択的生成を許容する条件下で当該us-p34プライマーを当該試料と反応させ、(iii)当該試料中のMOTTマイコバクテリア核酸のus-p34配列を決定することより成る、試料中のMOTTマイコバクテリア株の検出法に関する。

【0022】「us-p34配列を決定する」という表現は、例えば、直接配列決定により当該特異的MACコンプレックスのus-p34配列の存在を確認することを意味する。他の方法として質量分析法、キャピラリー電気泳動法、もしくはHPLCを用いることができる。

【0023】本発明はまた、(i)図2に示す如く表1もしくは2より選択される少なくとも1個のセンスおよびアンチセンスus-p34プライマーを提供し、(ii)当該試料中のマイコバクテリア核酸標的中のus-p34配列の増幅を許容する条件下で当該us-p34プライマーを当該試料と反応させ、(iii)(ii)で得られた増幅生成物の配列を決定することより成る、新規us-p34配列の決定法に関する。

【0024】「新規us-p34配列」という表現は新しい(未同定の)マイコバクテリア種の配列を意味する。これら新規配列のいくつかを図3に開示する。

【0025】本発明はまた、(i)図2に示す如く表1もしくは2より選択された少なくとも1個のセンスおよびアンチセンスus-p34プライマーを提供し、(ii)当該試料中の非結核菌マイコバクテリア核酸標的中のus-p34配列の選択的増幅を許容する条件下で当該us-p34プライマーを当該試料と反応させ、(iii)(ii)で得られた増幅生成物を図3に表される配列のグループから選択された少なくとも1個の非結核菌マイコバクテリア種特異的us-p34ヌクレオチドプローブと選択的にハイブリダイズさせ、(iv)当該us-p34ヌクレオチド配列を含有する全てのヌクレオチド二重らせんを検出し、(v)生成したヌクレオチド二重

らせんより特定の非結核菌マイコバクテリウム株の存在を推測することより成る、試料中のマイコバクテリアの鑑別検出法に関する。好ましくは、当該法で使用するべき当該プローブは表3に開示されている。

【0026】本発明はまた、図3に表された核酸配列の1個からの少なくとも8個の連続したヌクレオチド、もしくはその相補体、もしくはTがUで置換された対応する配列より成る、非結核菌マイコバクテリア種特異的us-p34ヌクレオチドプローブもしくはプライマーに関する。

【0027】本発明はまた、表1もしくは2より選択された上述の非結核菌マイコバクテリア種特異的us-p34ヌクレオチドプライマーに関する。

【0028】本発明はまた、表3より選択された上述の非結核菌マイコバクテリア種特異的us-p34ヌクレオチドプローブに関する。

【0029】本発明はまた、図3より選択された配列より成る核酸に関する。好ましくは、当該配列は当該配列識別番号の8個から全長の長さを有する当該配列識別番号のいずれかの連続配列である。

【0030】本発明はまた、上述の少なくとも1個のヌクレオチドプローブ、プライマーもしくは配列より成る組成物に関する。当該組成物は好ましくは、2個、3個もしくはそれ以上の当該成分を含有する。

【0031】本発明はまた、上述のプローブ、プライマーもしくは配列もしくは上述の組成物より成る診断キットに関する。

【0032】本発明はまた、表3より選択された少なくとも2個の捕捉プローブを当該担体に固定することより成るマイコバクテリア検出用固相担体に関する。

【0033】本発明はまた、上述の方法で使用するための上述の固相担体に関する。

【0034】本発明の方法を実施するために種々の技法を適用することができる。これらの技法は、標的核酸を増幅した後固相担体上に固定して標識オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイゼーションを行わせることより成っていてもよい。代わりに、本発明のプローブを固相担体上に(共有結合的にもしくは非共有結合的に)固定し、そして場合により増幅後に、ハイブリダイゼーションを標識標的ポリ核酸と行わせてもよい。本技法は逆ハイブリダイゼーションと呼ばれる。当該技法は当業者に周知である。

【0035】上述の増幅標的配列を検出する他のいずれの技法も本発明の対象として含まれていることを理解すべきである。そのような技法は当業者既知の配列決定法もしくは他のマイクロアレイ法を含むことができる。

【0036】以下の定義および説明は本発明のより良い理解を可能とするであろう。

【0037】分析試料中の標的物質は、DNAもしくはRNA、例えば、ゲノムDNA、メッセンジャーRNA

A、またはそれらの増幅物でもよい。これらの分子は本出願では「ポリ核酸」もしくは「核酸」とも呼称する。

【0038】試料よりのRNAもしくはDNAの単離のために周知の抽出および精製法が使用できる(例えば、Sambrookら、1989)。

【0039】本発明に従う「プローブ」という語句は、標的ポリ核酸に特異的にハイブリダイズするようにデザインされた1本鎖オリゴヌクレオチドを意味する。好ましくは、本発明のプローブは約5から50ヌクレオチド長であり、より好ましくは約10から25ヌクレオチド長である。特に好ましいプローブの長さは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24もしくは25ヌクレオチドを含む。本発明で使用されるヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、およびイノシンもしくはそのハイブリダイゼーション特性を本質的に変えることのない修飾基を含有するヌクレオチドのような修飾ヌクレオチドであってもよい。

【0040】本発明に従う「プライマー」という語句は、コピーされる核酸鎖に相補的であるところのプライマー伸長産物合成のための開始点として作用することができる1本鎖オリゴヌクレオチド配列を意味する。プライマーの長さおよび配列は、それらが伸長産物の合成を開始させるようなものでなければならない。好ましくは、プライマーは約5〜50ヌクレオチド長である。特定の長さおよび配列は、要求されるDNAもしくはRNA標的の複雑さならびに温度やイオン強度のようなプライマーが使用される状況に依存する。本発明のプライマーは、プローブとして、また実験条件を適合させるならば、その逆にも使えることを理解すべきである。

【0041】本発明における表現「適切なプライマー対」は、上に規定した特定のus-p34標的ポリ核酸断片の特異的増幅を可能とするプライマー対をいう。

【0042】本発明に従うプローブもしくはプライマーの「標的領域」という語句は、プローブもしくはプライマーが完全に相補的なもしくは部分的に相補的である(即ちある程度のミスマッチを含む)ところの検出されるべきポリ核酸内の配列をいう。当該標的配列の相補鎖もまた、場合により適切な標的配列であることを理解すべきである。

【0043】ポリ核酸の標的領域へのプローブの「特異的ハイブリダイゼーション」は、用いる実験条件下で当該プローブが本領域の一部もしくは全領域と二重らせんを形成すること、そしてそれらの条件下で当該プローブが分析試料中に存在するポリ核酸の他の領域とは二重らせんを形成しないことを意味する。

【0044】ポリ核酸の標的領域へのプライマーの「特異的ハイブリダイゼーション」は、用いる実験条件下で増幅段階中に当該プライマーが本領域の一部もしくは全領域と二重らせんを形成すること、そしてそれらの条件

下で当該プライマーが分析試料中に存在するポリ核酸の他の領域とは二重らせんを形成しないことを意味する。ここに使用される「二重らせん」は特異的増幅に導く二重らせんを意味することを理解すべきである。

【0045】増幅プライマーは、適正な増幅を保障するために、鋳型中で対応する標的配列に完全にマッチしている必要はないという事実は文献に詳細に記述されている。しかしながら、プライマーがその標的配列と完全には相補的でない場合には、増幅された断片はプライマーの配列を有していて標的配列を有していないであろうことを考慮する必要がある。プライマーは好みの標識(例えば、ビオチン)で標識してよい。使用する増幅法は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、核酸配列に基づく増幅(NASBA)、転写に基づく増幅系(TAS)、鎖置換増幅(SDA)もしくはQ β レプリカーゼを用いた増幅またはその他当業者既知のいかなる適切な核酸分子増幅法でもよい。

【0046】プローブおよびプライマー配列は、本明細書中を通して5'末端から3'末端への1本鎖DNAオリゴヌクレオチドとして表される。以下に特定するプローブのいずれもそのまま、もしくはそれらと相補的な形で、もしくはそれらのRNA形(ここではTがUで置換される)で使用できることは当業者には自明である。

【0047】本発明に従うプローブ、プライマーおよびその他の核酸配列は、対応するヌクレオチド配列を含む挿入物を含有する遺伝子組換えプラスミドのクローニングによって調製することができ、必要ならば、対応するヌクレオチド配列を適切なヌクレアーゼを用いてクローニングしたプラスミドから切り出し、例えば、分子量に基づく分画により回収して調製することができる。本発明に従うプローブはまた、例えば、従来のホスホートリエステル法により、化学的に合成することができる。

【0048】プライマーもしくはプローブとして使用するオリゴヌクレオチドはまた、ホスホロチオエート、アルキルホスホロチオエートもしくはペプチド核酸のようなヌクレオチド類似体から成っていてもよく、または挿入剤を含有していてもよい。本発明の元のDNA配列に導入される殆どの他の変化もしくは修飾のように、これらの変化は、要求される特異性および感受性を得るためにオリゴヌクレオチドが使用される条件に対して適合させる必要があるであろう。しかしながら、ハイブリダイゼーションの最終結果は未修飾オリゴヌクレオチドで得られるものと本質的に同じであろう。これらの修飾の導入は、ハイブリダイゼーションのキネティクス、ハイブリッド形成の可逆性、オリゴヌクレオチド分子の生物学的安定性その他のような特性に良い影響を与えるために有利であろう。

【0049】「固相担体」という語句は、それがハイブリダイゼーション特性を保持し、かつハイブリダイゼーションのバックグラウンドレベルが低いままに保たれる

ならば、オリゴヌクレオチドプローブをカップルできるいかなる基質をも指すことができる。通常固相基質は、マイクロタイタープレート、膜(例えば、ナイロンもしくはニトロセルローズ)または小球体(ビーズ)もしくはチップ(バイオチップ)であろう。膜に添加する前もしくは固定化する前に、固定を容易にもししくはハイブリダイゼーション効率を向上させるために核酸プローブを修飾するのが好都合であろう。そのような修飾は、ホモポリマーテイルの付加、脂肪性基、NH₂基、SH基、カルボン酸基のような異なる反応基とのカップリング、またはビオチン、ハプテンもしくはタンパク質とのカップリングなどを包含するであろう。

【0050】「標識された」という語句は標識核酸の使用をいう。標識化は、増幅のポリメラーゼ段階において取り込まれる標識ヌクレオチドもしくは標識プライマーの使用によって行ってもよく、または当業者既知のいかなる他の方法で行ってもよい。標識の本体はアイソトープによるもの(³²P、³⁵Sなど)でもアイソトープ以外によるもの(ビオチン、ジギキゲンニンなど)でもよい。

【0051】「生物学的試料もしくは試料」という語句は、例えば、鼻咽頭吸引物、喉もしくは鼻咽頭ぬぐい液、鼻咽頭洗浄液もしくは気管吸引物、またはDNAもしくはRNAより成るその他の気道試料をいう。

【0052】望ましい特性をもつプローブをデザインするために、当業者既知の以下の有用なガイドラインを応用することができる。

【0053】ここに記述するようなハイブリダイゼーション反応の程度および特異性は多数の因子により影響されるため、これらの因子の1個もしくはそれ以上の操作は、その標的に完全に相補的であるか否かに拘わらず、特定のプローブの正確な感受性および特異性を決定するであろう。種々のアッセイ条件の重要性および効果をここで更に詳細に説明する。

【0054】[プローブ: 標的]核酸ハイブリッドの安定性はアッセイ条件に合うように選ぶべきである。これは、長いA-Tに富んだ配列を避け、G:C塩基対でハイブリッドを終結させ、そして適切なT_m値のプローブをデザインすることにより達成できる。プローブの開始点と終結点は、その長さおよびGC%によりT_mが最終的なアッセイを行う時の温度よりも約2~10℃高くなるように選ぶべきである。G-C塩基対は、付加的水素結合のためにA-T塩基対に比べてより温度安定性が高いので、プローブの塩基組成は重要である。即ち、高いG-C含量の相補的核酸を含むハイブリダイゼーションは高温でより安定であろう。

【0055】イオン強度およびイオン強度温度のようなプローブ使用条件もまた、プローブをデザインする場合に考慮すべきである。ハイブリダイゼーションの度合いは反応混合物のイオン強度が増加するにつれて

増加すること、そしてハイブリッドの熱安定性はイオン強度の増加と共に増加することが知られている。他方、水素結合を破壊するフォルムアミド、尿素、DMSOおよびアルコールのような化学試薬はハイブリダイゼーションの厳密性を高める。このような試薬による水素結合の不安定化は T_m を著しく低下させる。一般的に、長さ約10～50塩基の合成オリゴヌクレオチドプローブの至適ハイブリダイゼーションは与えられた二重らせんの融解温度よりもおよそ5℃低い温度で起こる。至適温度以下の温度でのインキュベーションは、ミスマッチ塩基配列のハイブリダイゼーションを許すであろうし、そして、したがって低下した特異性をもたらす得る。

【0056】高い厳密性の条件下でのみハイブリダイズするプローブを持つのが望ましい。高い厳密性の条件下では高度に相補的な核酸のハイブリッドのみが形成し、十分な程度の相補性のないハイブリッドは生成しないであろう。したがって、アッセイ条件の厳密性がハイブリッドを形成する2個の核酸鎖の間に要求される相補性の度合いを決定する。厳密性の程度は、標的及び非標的核酸で生成したハイブリッド間の安定性における差を最大にするように選ばれる。

【0057】ハイブリッド形成を阻害する強固な内部構造を生じることが知られている標的DNAもしくはRNA中の領域はより好ましくない。同様に、著しい自己相補性を有するプローブは避けるべきである。上に説明したように、ハイブリダイゼーションは、相補的な核酸の2種類の1本鎖が会合して水素結合で結合した鎖を形成するものである。もし2本の鎖の片方がハイブリッドに全体としてもしくは一部分関与していれば、新しいハイブリッドの形成に参加することができにくくなることは改めて述べなくとも了解されよう。もし十分な自己相補性があるならば、プローブの片方のタイプの分子内で、分子内および分子間ハイブリッドが形成され得る。そのような構造は注意してプローブをデザインすることにより避けることができる。興味のある配列のかなりの部分が1本鎖になるようにプローブをデザインすることにより、ハイブリダイゼーションの速度と程度を大幅に増加させることができる。このタイプの相互作用を検索するコンピュータープログラムを利用することができる。しかしながら、ある特定の場合には、このタイプの相互作用を避けることは不可能かもしれない。

【0058】標準的なハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件は、実施例の実験材料および方法の項に開示してある。その他の条件は、例えば、3×SSC(クエン酸ナトリウム食塩水溶液)、20%脱イオンFA(フォルムアミド)を50℃で使用するこゝである。プローブの特異性および感度が維持されるならば、その他の溶液(SSPE(リン酸ナトリウムEDTA食塩水溶液)、TMAC(塩化テトラメチルアンモニウム)など)および温度も使用することができる。必要な場合には、要求され

る特異性および感度を与えられた環境下で維持するために、プローブの長さもしくは配列の修飾を行わなければならない。

【0059】「ハイブリダイゼーション緩衝液」という語句は、プローブと試料中に存在するポリ核酸もしくは増幅生成物との間で適切な厳密性条件下にハイブリダイゼーション反応を行わせる緩衝液を意味する。

【0060】「洗浄液」という語句は、適切な厳密性条件下に生成したハイブリッドの洗浄を可能ならしめる溶液を意味する。

【0061】ここまで一般的な記述を行ってきた本発明は、以下の実施例および図を参照することによってより容易に理解することができるであろうが、これらは単に本発明のある態様と実施態様を具体的に説明する目的で含めるものであり、本発明をいかなる意味でも限定するものではない。ここに述べる引用文献は全て参考資料として組み入れられている。

【0062】(図面の簡単な説明)

図1: *M. bovis* (MB)、*M. tuberculosis* (MT)、*M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MPT)および*M. avium* ss(MA)のus-p34遺伝子の多重ヌクレオチド配列アラインメント。配列間のギャップを点(.)で示す。縦棒(|)は配列間の同一性を示す。p34 ORFの開始コドン(ATG)は肉太活字になっている。プライマーの配列を影つき棒で示す。矢印は、*M. tuberculosis*および*M. bovis*および*M. avium* subsp. *paratuberculosis*および*M. avium* ss間の点突然変異を示す。

図2: us-p34領域のプライマーU1、U2、U3、U4およびU9による増幅。

図3: 新規us-p34配列(5'から3'向き)。配列を得るために使用したプライマー(U2-U1; U3-U1; U4-U1; U2-U9; U3-U9もしくはU4-U9のいずれか)およびアンプリコンのサイズを示す。追加的内部プライマー(U1、U2、U3)は配列内に示してある。同じ種(例えば、*M. ulcerans*)内に見出された配列変化(点突然変異)も知られている場合示してある。

図4: 異なるマイコバクテリア種のus-p34領域のU1-U4コンセンサス増幅。

図5: 特異的および非特異的ハイブリダイゼーション。

図6: 種特異的マイコバクテリアプローブを開示する、マイコバクテリアの標的アンプリコンのナイロン膜上におけるディファレンシャル逆ハイブリダイゼーション。
a)種々のマイコバクテリア種に特異的な非標識増幅DNAセグメントをまずナイロン膜上に移した(*M. tuberculosis* (TB)、*M. avium* (AV)、*M. szulgai* (SZ)、*M. kansasii* (KA)、*M. xenopi* (XE)、*M. simiae* (SI)および*M. malmoeense* (ML))。

b) *M. tuberculosis* (TB*), *M. avium* (AV*), *M. szulgai* (SZ*), *M. kansasii* (KA*), *M. xenopi* (XE*)および

M. simiae (SI*)由来のジゴキシゲニン標識アンプリコンをナイロン膜上でハイブリダイズさせた。特異的ディファレンシャルハイブリダイゼーションが得られる。

図7: *M. gordonae*を特異的に検出するバイオチップの例。

図8: いくつかのマイコバクテリアのus-p34配列のアラインメント。

【0063】

【実施例】(マイコバクテリアDNAの調製)

a) 短いプロトコール(パスツール研究所から入手したマイコバクテリア): マイコバクテリアDNAを溶液に溶出させるため試料を煮沸することによりDNAが得られている。

b) 長いプロトコール(熱帯医学研究所より入手したマイコバクテリア): マイコバクテリア(10mg(湿重量))を溶解溶液(0.1M NaOH、1M NaCl、および5%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS])200μlに懸濁し、20分間加熱(100℃)した。次いで、懸濁液を冷却し、3倍量の0.1M Tris-HCl(pH 7.4)緩衝液で中和し、遠心分離(5,000×g、5分)した。上清をフェノールクロロフォルムで抽出し、DNAをエタノールで沈殿させ、遠心分離して集め、50μlのH₂Oに溶解し、20℃で保存した。

【0064】(PCR増幅)増幅には、DNA試料のアリコート(10μl)を、10mM Tris-HCl(pH 8.8)、1.5mM MgCl₂、50mM KCl、0.1% Triton X-100、0.25mM(各々)デオキシヌクレオシド三リン酸、各プライマー(表1および2)10pmolおよびDyNAzyme DNAポリメラーゼ(Finnzymes Inc., Espoo, フィンランド)0.625Uより成るPCR混合液90μl中に添加した。最初の熱変性ステップ(96℃で3分)の後、30サイクルの増幅を以下のように実施した: 即ち、96℃で30秒変性、58℃で45秒アニーリング、および72℃で30秒DNA伸長とし、変性および伸長段階についてはサイクル毎に1秒ずつ増加した。最終の伸長は72℃で15分間行った。増幅はDNA2400サーモサイクラー(Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, Calif.)中で行った。PCR生成物は2%(w/v)アガロースゲルにかけてチェックした。電気泳動は1ml当り臭化エチジウム0.5μgを含有する0.1M Tris-HCl(pH 8.6)、80mM ホウ酸、1mM EDTA緩衝液中で行った。DNA断片は、UVトランスイルミネーター上300nmで視覚化される。PCR産物をTOPO XL PCRクローニングキット(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)を用いて、メーカーのプロトコールに従ってクローニングした。クローンは、更にTaq Dye Deoxy Terminator Cycle配列決定キットおよびABI377DNAシーケンサー(Perkin-Elmer Applied

Biosystems)で配列決定した。

【0065】(DNA配列分析)ヌクレオチド配列分析は、ウイスコンシン大学より入手したGenetics Computer Groupソフトウェアを用い、Belgian EMBnet Node施設を利用して実施した。配列はPileupプログラムによりアラインメントを行い、Bestfitプログラムにより対比較を行った。

【0066】(逆ハイブリダイゼーション分析)標準株から得たus-P34クローン化DNAをプライマーU1およびU4で増幅することにより、マイコバクテリア種特異的捕捉プローブを作成した。増幅したDNA断片をサザンブロット法に従って順次ナイロン膜(Hybond-N+; Amersham, Little Chalfont, 英国)上に移した。プレハイブリダイゼーションを2時間行った後、標準もしくは臨床マイコバクテリアのゲノムDNAをDIG-11-dUTP存在下にプライマーU1およびU4(表1)でPCR増幅して得た、us-p34ジゴキシゲニン標識標的プローブと膜をハイブリダイズさせた。熱変性した標的プローブ(95℃で5分間)のハイブリダイゼーションは、2×SSC(1×SSCは0.15M NaClおよび0.015Mクエン酸ナトリウム)、1%ブロッキング試薬、0.1%SDS、0.1%N-ラウロイルサルコシン、5mg/mlのサケ精子DNAおよび5%フォルムアミド中で50℃で4時間行った。次いで、フィルターを2×SSC(1×SSCは0.15M NaClプラス0.015Mクエン酸ナトリウム)-0.1%SDSで37℃で5分間ずつ2回洗浄し、0.2×SSC-0.1%SDSで50℃で5分間ずつ2回洗浄した。ハイブリダイズしたジゴキシゲニン標識DNA断片をアルカリホスファターゼ標識抗DIG Fab断片により検出した。Nitro Blue Tetrazolium Chlorureおよび5、3-ブromo-4-インドリルホスフェート(BCIP)(Boehringer Mannheim)を用い、メーカーの使用説明書に従って比色検出を実施した。

【0067】(「マイコバクテリアバイオチップ」上での分析)バイオチップのデザイン。マイコバクテリアマイクロアレーはATT(Namur, ベルギー)により開発されている。このアレーは、表面に異なるマイコバクテリア種特異的捕捉ヌクレオチド配列をつけたガラスのスライドである(表3)。固定化、陽性および陰性ハイブリダイゼーション対照の捕捉プローブもこのアレーに含まれており、このアレーの捕捉プローブは各4個の反復より成っている。

【0068】バイオチニル化アンプリコンの作成。マイコバクテリアus-p34配列の増幅は、2.5mM MgCl₂、75mM Tris-HCl、pH 9.0、50mM KCl、20mM (NH₄)₂SO₄、プライマーU4およびU5各0.5μM、200μM dA

TP、200 μ M dCTP、200 μ M dGTP、150 μ M dTTP、50 μ M ビオチン-16-dUTP、ウラシル-DNA-グリコシラーゼ(Boehringer Mannheim, ドイツ)0.5U、Taq DNAポリメラーゼ(Biotools, Madrid, スペイン)1.25UおよびDNAテンプレート10 μ lを含有する最終液量50 μ l中で行われる。試薬は、最初94℃で5分間インキュベートし、次いでDNA9600サーモサイクラー(Perkin Elmer, Foster City, CA, 米国)中以下の温度およびサイクル時間を用いて40回サイクル反応を行う：即ち、94℃で30秒、49℃で45秒、72℃で30秒。72℃10分間の最終の伸長段階を行う。PCR産物は直接使用するかもしくは-20℃で保存する。

【0069】ハイブリダイゼーションおよび比色検出。PCR産物の検出操作は以下の通りメーカーの使用説明書(ATT, Namur, ベルギー)に従って行われる：即ちPCR産物5 μ lおよびキットに提供されている陽性対照5 μ lを新鮮な0.05N NaOHで室温5分間変性させる。次いでこの溶液をハイブリダイゼーション溶液35 μ lと混合しハイブリダイゼーションチャンバー(Biozym, Landgraaf, オランダ)に囲まれたアレー上に装填する。チャンバーをプラスチック製のカバースリップで閉じ、ハイブリダイゼーションを53℃で30分間行う。スライドを洗浄用緩衝液で1分間ずつ4回洗浄する。ガラスの試料を次いでブロッキング緩衝液で1000倍希釈したストレプトアビジン複合体800 μ lと共に室温で45分間インキュベートした。5回洗浄した後、スライドを発色用混合液800 μ lと10分間ずつ3回インキュベートし、次いで水洗し、乾燥して比色マイクロアレーリーダー(ATT, Namur, ベルギー)を用いて描像する。目視による一瞥で既に像に関連する情報の殆どが得られるが、スポットの強度を定量化するアルゴリズムおよびパターン認識アルゴリズムにより、得られた像を分析する。

【0070】(マイコバクテリウム種上流P34領域のクローニングおよび配列決定)M. tuberculosis (GenBank登録番号第Z79700号)およびM. avium subsp. paratuberculosis (GenBank登録番号第X68102号)由来の相同p34遺伝子およびその調節配列(上流p34即ちus-p34)の比較は、M. tuberculosisのp34タンパク質の開始コドンの上流領域に欠失があることを示した(図1および2)。これらの知見を確認し拡張するために、M. bovis BCGおよびM. avium D4のus-p34配列を増幅し配列を決定した。この領域の多重配列アラインメントは結核菌(M. tuberculosis)およびM. bovis Bacille de Calmette et Guérin (BCG)および非結核菌(M. avium spおよびM. avium subsp. paratuberculosis)マイコバクテリアの双方に特異的な種間多型性を明らかにした、即ち、us-34断片が結核菌では79塩基短くなっていた。逆に、us-p34は

各グループ内では高度に保存されていた：即ち、M. tuberculosisとM. bovis間の差は、us-p34の41番目におけるTからCへの1個の塩基転移に依存しており、そしてM. avium ssとM. avium subsp. paratuberculosisでは、us-p34の264番目においてCからGへの1個の塩基変換に依存していた(図1)。

【0071】M. tuberculosis/M. bovisおよびM. avium/M. avium subsp. paratuberculosis間の配列相同性に基づき、多型性us-p34の保存配列にマッチするいくつかのオリゴヌクレオチドU1、U2、U3、U4およびU9(表1および2)をデザインして、マイコバクテリウム属の他の標準菌M. szulgai、M. africanum、M. gordonae、M. gastri、M. kansasii、M. marinum、M. ulcerans、M. intracellulare、M. scrofulaceum、M. xenopi、M. malmoenseおよびM. simiae(表3)の対応領域を増幅した。これらの断片をクローニングし配列を決定した(図3)。

【0072】(マイコバクテリウム種のコンセンサスPCR増幅の開発)マイコバクテリウムのus-p34の配列に基づいてコンセンサスPCRアッセイを開発した。プライマーU1およびU4を用いて、M. szulgai(163bp)、M. non chromogenicum(169bp)、M. tuberculosis、M. bovis、M. africanum(178bp)、M. gordonae(182bp)、M. gastri(223bp)、M. kansasii(225bp)、M. marinumおよびM. ulcerans(236bp)、M. intracellulare、M. avium、M. paratuberculosis(256bp)、M. scrofulaceum(259bp)、M. xenopi(256bp)、M. leprae(269bp)、M. malmoense(290bp)およびM. simiae(298bp)について、163bpから298bpの長さに亘る対応する断片を増幅させた(図4；表4)。全てのマイコバクテリアの配列とM. tuberculosisのus-p34領域との一対ずつの部分的アラインメントに図示されるように、配列アラインメントはサイズおよびヌクレオチド配列の両方について多型性を示す。

【0073】(臨床分離株についてのコンセンサスmyc-U1-myc-U4 PCRのバリデーション)本コンセンサス増幅法の信頼性を1連のマイコバクテリアの臨床分離株(表4)について検討した。この方法は殆どのマイコバクテリアに対して高感度であるという特徴を有している。ある種のものについて見られる低い感度は、この方法の感度の無さよりも多分DNA試料に関係するものである。事実、M. marinum-M. ulceransの増幅は「短プロトコル」DNA標品(4/10)より「長プロトコル」DNA標品(20/20)により高感度を示す。これら「短プロトコル」DNA製剤の品質は、これ以上の結論を出す前にチェックする必要がある。これは実際、他のマイコバクテリア種(例えば、M. phlei、M. flavescens、M. nonchromogenicum、M. chelonae

など)における潜在的に特異的なアンプリコンの更なる同定に影響を及ぼす可能性がある。

【0074】(種特異的PCR増幅法の開発)U1およびU4の間(殆どの種間差を含む)もしくは最も幅広くU9およびU2の間(特異的株間差を含むと思われる)の全ての上流p34のアラインメントに基づき、選択的に1つの株を増幅するプライマー(2個の新規プライマーもしくは1個の新規プライマーと表1および2に示した1個のプライマーの組み合わせ)をデザインした。この方法はマイコバクテリウム種のPCRによる鑑別を可能にする。

【0075】(逆ハイブリダイゼーション方法)同種由来のアンプリコンおよび2つの異なる種由来のアンプリコンのそれぞれ相同および非相同ハイブリダイゼーション(図5)に基づき、逆ハイブリダイゼーションアッセイを設定した。第1段階では、2個のコンセンサスプライマーU1およびU4を用いて標準株のu s - p 34のクローン化DNAを増幅することにより、各マイコプラズマ種に対応する種特異的プローブを作成し、そしてナイロン片に固定した。同定すべき種のDNAを同じプライマー存在下に増幅し、5'末端をビオチニル化し、固相化したプローブとハイブリダイズさせ、そして比色アッセイした。M. tuberculosis、M. avium、M. szulgai、M. xenopi、M. simiaeおよびM. malmoenseを正確に識別したアッセイを図6に示す。

【0076】(「マイコバクテリアバイオチップ」の開発)多型性u s - p 34配列はまた、マイコバクテリアの同時種特異的検出法を開発するために、低密度マイクロアレイテクノロジーに応用することができる。予備的な研究では、種々のマイコバクテリア種特異的捕捉プローブをくっつけたマイコバクテリアマイクロアレイがA

TT (Namur、ベルギー)により開発されている。これらのプローブを異なるマイコバクテリア種由来のu s - p 34ビオチニル化アンプリコンとハイブリダイズさせた。M. gordonaeをM. tuberculosis、M. gastri、M. kansasii、M. intracellulare、M. leprae、M. avium、M. marinum、M. simiae、M. xenopi、M. malmoense、M. szulgaiおよびM. scrofulaceum特異的捕捉プローブに対して特異的に検出した実例を図7に示す。

【0077】参考文献

1. Portaels f. マイコバクテリア性疾患の疫学. Clin ics in Dermatology 1995; 13: 207-222.
2. Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. 結核のグローバル疫学: 全世界的流行病の罹患率および死亡率. JA MA 1995; 273: 220-26.
3. Cobelens FG, van Deutekom H, Draayer-Jansen IW ら. 結核猖獗地域への旅行者における結核菌感染の危険性. Lancet 2000; 356: 461-465.
4. Pablos-Mendez A, raviglione MC, Laszlo Aら; 抗結核薬抵抗性に関する1994年から1997年までのグローバルサーベイランス. New Engl J Med 1998; 338: 1641-49.
5. Tsang AYおよびFarber ER. Mycobacterium ulceransの初代分離. Am. J. Clin. Pathol. 1973; 59: 688-692.
6. Portaels F, Fonteyne PA, De Beenhouwer H, de Rijk P, Guedenon A, Hayman J, Meyers WM. Mycobacterium ulceransの16S rRNAの3'末端の変異性は分離株の地理的由来と関連している. J. Clin Microbiology 1996; 34:962-965.

【表1】

表1. オリゴヌクレオチド

これらのコンセンサスプライマーは標準および臨床分離マイコバクテリア株の幅広いパネルの増幅に好適に使用された(表4参照)。

U1: 5'-GAGTAGGTCATGGCTCCTCC-3' (アンチセンス)
U4: 5'-CATGCAGCGAATTAGAACGT-3' (センス)

【表2】

表2. オリゴヌクレオチド

U2: 5'-AACTTGACGAAGCTCGCCG-3' (センス)
U3: 5'-AGGTATTCGCGCAGCATG-3' (センス)
U5: 5'-GTASGTCATRRSTYCTCC-3' (アンチセンス)
U9: 5'-GGTGAACATTGGGCCGAA-3' (アンチセンス)

U5は縮重型プライマーの一例であり、コンセンサスプライマーもしくはユニバーサルプライマーとしてのU4との組み合わせで種々のマイコバクテリア種のDNA断片を増幅するのに使用した。これらのマイコバクテリア種は、次いでバイオチップ上で逆ハイブリダイゼーションにより同定することができた。

【表3】

表 3. バイオチップ上でマイコバクテリア株と特異的にハイブリダイズ
することができる捕捉プローブの例

Avium :	CGGTCGTCTCCGAAGCCCGCG
Gastrii 1 :	GATCGGCAGCGGTGCCGGGG
Gastrii 2 :	GTATCGCGGGCGGCAAGGT
Gastrii 3 :	TCTGCCGATCGGCAGCGGTGCCGG
Gastrii 4 :	GCCGGGGCCGGTATTGCGGGGCGG
Gordonae :	GACGGGCACTAGTTGTCAGAGG
Intracellulare 1 :	GGGCCGCCGGGGCCTCGCCG
Intracellulare 2 :	GCCTCGCCGCCAAGACAGTG
Leprae:	GATTTCGGCGTCCATCGGTGGT
Kansasii 1 :	GATCGTCGGCAGTGGTGACGG
Kansasii 2 :	TCGTCGGCAGTGGTGAC
Kansasii 3 :	ATCCGCCGATCGTCGGCAGTGGTGACG
Malmoeense :	GACCCACAACTGCTCGGGC
Marinum :	CGGAGGTGATGGCGCTGGTTCG
Scrofulaceum :	CGGGCGCACGGATCGGCGTC
Simiae :	ATCGCTCCTGGTCGCGCCTA
Szulgai :	CCCGGCGCGACAGCAGAACG
Tuberculosis:	GCCGTCCAGTCGTTAATGTCCG
Xenopi:	CGGTAGAAGCTGCGATGACACG

【表4】

表 4. 臨床マイコバクテリア株上のコンセンサス
U1-U4増幅のバリデーション

マイコバクテリア	サイズ(bp)	+ 増幅数/試料数
<u>Tuberculosis 群</u>		
M. tuberculosis	177	15/15
M. bovis	177	9/10
M. africanum	177	5/5
<u>M. avium コンプレックス</u>		
M. avium	258	18/17
M. paratuberculosis	258	21/21
M. intracellulare	258	9/9
M. scrofulaceum	259	4/5
<u>MOTT (放線菌以外のマイコバクテリア)</u>		
M. szulgai	163	9/9
M. kansasii	226	10/11
M. gastri	223	2/2
M. xenopi	265	12/12
M. ulcerans	211	20/20
M. leprae		1/1
M. non chromogenicum		1/2
M. simiae	298	6/11
M. malmoeense	280	4/7
M. gordonae	182	4/10
M. marinum	238	1/14

【図面の簡単な説明】

【図1】 M. bovis (MB)、M. tuberculosis (MT)、M. avium subsp. paratuberculosis (MPT)およびM. avium ss (MA)のu s - p 34遺伝子の多重ヌクレオチド配列アラインメント。配列間のギャップを点(.)で示す。縦棒(|)は配列間の同一性を示す。p 34 ORFの開始コドン(ATG)は肉太活字になっている。プライマーの配列を影つき枠で示す。矢印は、M. tuberculosisおよびM. bovisおよびM. avium subsp. paratuberculosisおよびM. avium ss間の点突然変異を示す。

【図2】 u s - p 34領域のプライマーU1、U2、U3、U4およびU9による増幅。

【図3】 新規u s - p 34配列(5'から3'向き)。配列を得るために使用したプライマー(U2-U1; U3-U1; U4-U1; U2-U9; U3-U9もしくはU4-U9のいずれか)およびアンプリコンのサイズを示す。追加的内部プライマー(U1、U2、U3)は配列内に示してある。同じ種(例えば、M. ulcerans)内に見出された配列変化(点突然変異)も知られている場合示してある。

【図4】 異なるマイコバクテリア種のu s - p 34領域のU1-U4コンセンサス増幅。

【図5】 特異的および非特異的ハイブリダイゼーション。

【図6】 種特異的マイコバクテリアプローブを開示する、マイコバクテリアの標的アンプリコンのナイロン膜上におけるディファレンシャル逆ハイブリダイゼーション。

a)種々のマイコバクテリア種に特異的な非標識増幅DNAセグメントをまずナイロン膜上に移した(M. tuberculosis (TB)、M. avium (AV)、M. szulgai (SZ)、M. kansasii (KA)、M. xenopi (XE)、M. simiae (SI)およびM. malmoeense (ML))。

b)M. tuberculosis (TB*)、M. avium (AV*)、M. szulgai (SZ*)、M. kansasii (KA*)、M. xenopi (XE*)およびM. simiae (SI*)由来のジゴキシゲニン標識アンプリコンをナイロン膜上でハイブリダイズさせた。特異的ディファレンシャルハイブリダイゼーションが得られる。

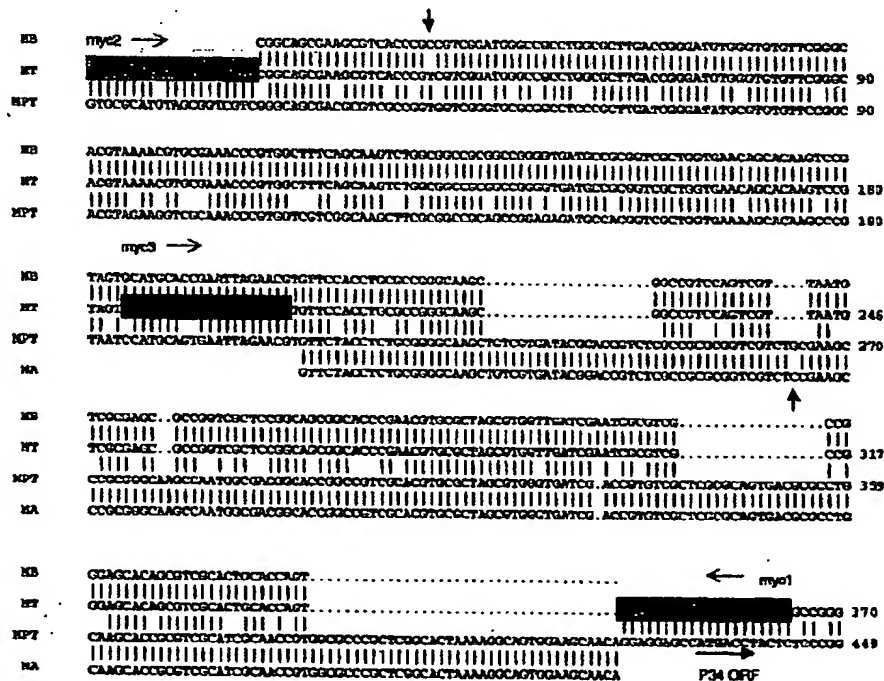
【図7】 M. gordonaeを特異的に検出するバイオチップの例。

【図8】 いくつかのマイコバクテリアのu s - p 3 4 配列のアラインメント。

【図1】

Figure 1.

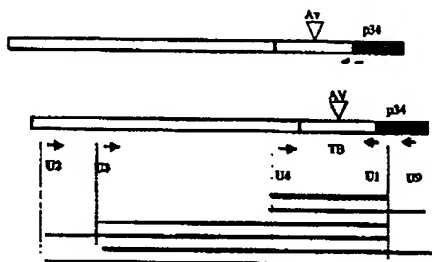
M. bovis (MB)、M. tuberculosis (MT)、M. avium subsp. paratuberculosis (MPT) および M. avium ss (MA) の u s - p 3 4 遺伝子の多重ヌクレオチド配列アラインメント。配列間のギャップを点(.)で示す。縦棒(|)は配列間の同一性を示す。p 3 4 O R Fの開始コドン(ATG)は肉太活字になっている。プライマーの配列を影つき枠で示す。矢印は、M. tuberculosisおよびM. bovisおよびM. avium subsp. paratuberculosisおよびM. avium ss間の点突然変異を示す。



【図2】

Figure 2

us-p34領域のプライマーU1、U2、U3、U4およびU9
による増幅



■ P34の読み取り枠
▽ 結核菌マイコプラズマ (TB) のus-p34領域の79bp欠失
→ プライマー

【図3-2】

M. intracellulare 長さ: 216

```

1  GTTCTACCTG TGCTGAGCAA GCTCCGGTGA TACCGACCGT CTCGCCGGAG
51  GGCCGCCCGG GGCCTCGCCG CCCAAGACAG TGGCGGGCCG ACCGGTTCCC
101 GCACGTGCGC TAGCGTGGGT GATCGACCGC GTCGCAATGC GGTGACGGCG
151 CTGCAAGCAC AGCGTGGCAT CGCCACCGCG GCGCCCGCTC GGCACCTAAA
201 GGCACGTGTA GCAACA

```

M. kansasii 長さ: 785

```

1  GTGCGCCGGC GCGCCGGCGG CACGCCATGG TCAGCGAGTT CGTCGGTGTG
51  CCAGCCGAAT CCGACGCCGA CGCTGACCCG CCCCCGGAT AGGTGGTCCA
101 GCGTGGCAAT GCTTTGGCC AGCGTGATCG GGTCAATGCT GACCGGCAC
151 GCAACCGCTG TTGACAGTGG GACCCGGAAG GTGACCGCTG AAGCCGCGCC
201 CAAACTCACC CACGGGTCCA GCGTGGCAT ATAGCGGTG TCCGGCAGCG
251 ACGCGTCAAC CGTCGTGGGA TGGCGGCCCT CCGTTTGACC GGGATGTGCG
301 TGTGTTCCGG CAGTAGAAA GTGCGAAGC CATGGTCTG GGCAGTTTC
351 GCGGTGCGG CCGGAGAAAT GCCACGGTCG CTGGTGAATA GGACAAGCC
401 GTAATCCATG AACAGATTA GAACGTGTTT TACCTCAGCC GGGCAAGCG
451 CTCATCCGCC GATCGTCCGC AGTGGTGACG GGGCCGGTAT CACGGGGCA
501 AGGTGCCAC GCGCGAGTA CCAGGCCGTG CGCTAGCGTG GGTATCGAA
551 TCGTGTGCA GGGAGCAATC GTCGATTGC AGCAGCGTA GCGACGGAC
601 TGGAGGTAA CAGGAGGCC ATGACCTACT CACAGGTAG TCCCGATAT
651 CCGCCCGCGC AATCGGCCGG CTCCTACGGA GCCGCCACAC CGTCTTCGC
701 CAAGGCCGAC GACGGTGCA GCAAGCTTC GATGTACCTG AGCATGGCG
751 TTGCCGCGCT CCGGCTGCTG GCGTATCTGG CCAGC

```

M. malmoense 長さ: 741

```

1  TCGTAGGCGC CTTCCTCTG GGTCCACAGC GCGCGCATTG CCTCGATGTA
51  TTCACGCAGC ATGGTCCGAC GCGCGCGCGC CGGCACGCGC TGGTCGGCA
101 GCTCGTCGGT GTTCAGOCA AACCCAGGC CAGGCTGAC CCGGCGCGG
151 GACAGGTGGT CCAAGGTGGC AATACTTTTC GCCAGCGTGA TCGGTCGTG
201 CTCGACGGGC AGCGCCACCG CGGTAGACAG CGGCACCGC GACGTCACG
251 CGCACGCCG GCGCAGGCTC ACCCAGCGT CTAGCGTGC CATATAGCG
301 TCGTCCGCA AGCGACGCGC CACCCGTCT GGAATGGCC GCTCGCGCT
351 TGACCGGGAT ATGGGTGTGT TCCGGCAGT AGAACGTCT GAGCGGTGG
401 TCGTCGGCAA GTTTGGCGC TCGCGCGGG GAGATGCGG GGTGCTGCT
451 GAAAAGTACA AGCCGTAAT CCATGGACAG AATTAGAAC GTTCTACCG
501 GCGGTGGCA AGCGCTGCG CCGCGAGGA TCTCGACTG GACCCACAAC
551 ACTGGTCGGC GCGCGCGCG CCGACAGGTC GGTGCGCCG GCACGGCGG
601 CCGAACGTGC GCTAGCGTGG GTGATCGAT CCGTCGCAAC GCAAGATCT

```


【図3-1】

Figure 3. 新規 us-p34 配列

M. gastri 長さ: 642

```

1  GTGCGCCGGC GCCCGGGCGG CACGCCATGG TCGGCGAGTT CGTGGCCCCG
51  GCGGCACGCC ATGGTCGGCG AGTTCGTCGG TGTCCAGCC GATCCGACG
101 CCGACGCTGA CCCGGCCCCC GGATAGTGGT CCAGCGTGGC AATGCTTTTG
151 GCCAGCGTGA TCGGGTCATG CTCACCCGCA GCGCAACCGC GGTGACAGC
201 CTGACTCGGG AGGTGACCGC TGAAGCCGCA CCCAAGCTCA CCCACGGTC
251 CAGGGTGGCG ATATAGCGGT CGTCCGGCAG CGACGCTCA CCCGTCGTGG
301 GATGGCGCGC TTCCCGTTTG ACCGGGATAT GCGTGTGTTC CGGCACGTAG
351 AGAGTGCAGG AGCCATGGTC GTCGGCCAGT TTCGCGGCTG CCGCCGGGA
401 GATCCACCGG TCGCTGGTGA AAAGGACAAG CCGTAATCC ATGAACAGAA
451 TTAGAACGTG TTCTACCTCC GCCGGGCAAG CGGCTCATCT GCCGATCGGC
501 AGCGGTGCGG GGGCCGGTAT CGCGGGCGGC AAGGTGCGCA CGGCGTGAGT
551 ACCCGGCCGT GCGCTAGCGT GGGTCATCGA ATTGTGTCGC AGGGAGCAAT
601 CGTCGCATTG CAGCAGGCGT AGCGACGGCA CCGGAGGTAA CA

```

M. gordonae 長さ: 745

```

1  GTGCGACGAC GGCCGGCCAG CACGTTATGG TCGGCGAGCT CGTCGGTGTT
51  CCAGCCGAAC CCGACGCCGA GGCTAACTCG CCCGCCGAC AGGTGATCCA
101 GCGTGGCGAT GCTTTTCGCC AAGGTGATCG GGTGATGCTC GACCGGCAAC
151 GCGACTGCCG TCGACAGCCG CACCCGCGAC GTCACAGCAC ACGCCGCGCC
201 CAGGCTCACC CAGGGATCCA GGGTCCGCAAT ATAAAGGTG TCGGGCAGCG
251 TCTCGTCTCC GGTGGTGGGA TGAGCCGCCT CGCGTTTGAT CGGGATATGC
301 GTGTGTTCGG GTACGTAGAA GGTGTGAAAA CCATGTGTGT CCGCAAGTTT
351 CGCTGCTGCC GCAGGGGAAA TACCGCGATC GCTGGTGAAC AGAACGAGGC
401 TGTAGTCCAT GCGCCAAATT AGAACGTGTT CTACTTTTGG CCGCAGCCGA
451 CCCCCTGCGG CGACGGGCAC TAGTTGTGAG AGGTGCGCTA GCGTGGTTGA
501 TCGAATGCGT CGCAGGCCGT ACCGCGTCGT GCCGAAGCAG AGGGGCCGTG
551 ACGGCACCGG AAGCAACAGG AGGACTTATG ACCTACCCGC CCGGTAGTCC
601 CGGATATCCA TCCGCCAGC AGTCGGCCGG CAACTACGGC AGCTCCGCTC
651 CCGCCGCGCG CCAGTCCGAG CCGGGTGAAA GCAAGCTGGG ACTGTACCTG
701 GCCATCGCGG TGGCGGCCCT GGGCCTACTG GCCTACCTCT TCAGC

```

【 3-3 】

651 GAAGGTGTTT TCAAAGGCGG CGCGCTGGA AGTGCAGCGT CGCCCGCAA
 701 ATGCGCGTC GCTGAGGTC TTGAAGGCAC TGAAGCAAT A

M. simiae 長さ : 748 2001年1月30日 10:09 タイプ : N チェク : 6957 ..
 U3, U4

1 TCGTATTGGG CTTCTTCCTG CGTCCACAGC GCCCGCATGG CTTCCAGGTA
 51 CTCGCGCAGC ATGGTCCGCC GCGCGCCCGG CGGCACGTTG TGGTCGGCCA
 101 GTTCGTGGGT GTTCCAACCG AACCCGACGC CCACACTGAC CCGTCCGCCG
 151 GACAGATGGT CCAGGGTGGC GATGCTTTTC GCCAGCGTGA TCGGTCGTG
 201 CTCGACGGGC AGCGCGACCG CGGTGGACAG TCGACCCCGC GAGGTGACCG
 251 CGCACGCCGC GCCCAGACTG ACCCAGGGT CCAGCGTGGC CATGTAGCGG
 301 TCGTCGGGCA GCGATTCTG GCGGCTCGTG GGTGGGGCG CCTCGCGCTT
 351 GATCGGGATG TGAGTGTGTT CTGGCAGGTA GACGTTGTG AAGCCATGGT
 401 CGTCGGCGAG TTTGGCCGCG GCCGCCGGG CGTGCCTCCG ATCACTGGTG
 451 AAAACACGA GCCCGTAATC CATGCACAGA ATTAGAAGT GTTCTAOCYC
 501 TGTGGAGCAA GCGGCCCGCG CTACGTCGAC CCGCAGACCG GCCGCTGAGA
 551 CGATCGCTCC TGBTCGGGCC TAGGGGCCGG TCGCTCCCGC GCACCCGCTC
 601 GAACGTGCGC TAGCGTGGTT GATCGGTGCG GCGTAACGCA AACGCGGGCA
 651 CGCCCTGGCG TCACCGACGG GCGAGCCCTG CAGACACGGC GTCGCACTGC
 701 AGCAGTGACG TCGCGCCCGA CGAGGTCTTG AAGGCACTGG AAGCAACA

M. Szulgai 長さ : 712

1 GTGCGCGCGC GCCCGGCCGG GACGCCGTGA TCAGCGAGCT CGTCGGTATT
 51 CCAGCCGAAG CCGACGCCGA GGCTGACCCG GCTGCCGGAC AGATGATCCA
 101 GCGTGGCAAT GCTTTTGCCG AGCGTGATCG GATCATGCTC GACCGGCAGC
 151 GCCACCGCGG TGGACAACCG GACCCGAGAC GTCACCGCGG CCGCAGCACC
 201 CAAACTCACC CACGGGTCCA GCGTGGCAT CTAGCGGTCA TCGGCGAGCG
 251 ACGCGTCACT CGTAGTGGGA TGGGCGCCT CCCGCTTGAT CCGGATGTGG
 301 GTGTGTTCAG GCACGTAGAA CGTCTGAAAA CCGTGGTCTG CGCCAGCTT
 351 TCGCGCGGCC GCCGGGCAA TGCCGCGATC GCTGGTGAAA AGTACAAGCC
 401 CGTAATCCAT GCACCGAATT AGAAGTGTT CTACCTGCGA TGAGCAAGCG
 451 GCCCGGTCGG CCGACGAGCA GGTGCGCCCG GCGCGACCAE CAGAAGCTCC
 501 GCTAGCGTGG TTGATCGAGT CGCGACCCGG AAAGCAACCG GAAGTAATCA
 551 GGAGGAGCCA TGACCTACTC GACCGGCAGC CCCGGATATC CGCCTGCGCA
 601 GCAGCCCGGG GGGTCGTACG GCGGCGCCAC TCTGGTGAC GCTCAGAGCA
 651 AGCTTCCGCT GTAOCTCAGC ATGGCGGTGG CCGCCCTCGG CCTGGCCGCG
 701 TATCTCGCCA GC

【図3-4】

M. tuberculosis 長さ : 802

```

1 TCATAGCAGG CCTCCTCTTG GGTCCACAAC GCCCGCATCG CCTCGAGGTA
51 TTCGCGCAGC ATGGTGCGGC GCGGTCCGGG TGGCACACCA TGATCGACGA
101 GCTCGTCGGT GTTCCAGCCG AACCCGACCC CGACGCTGAC CCGGCCGTGC
151 GACAAATGAT CCAGCGTCGC AATGCTTTTC GCCAGCGTGA TCGGATCATG
201 CTCGACCGGC AGCGCCACCG CCGTGGCAAG CCGGATCCGC GACGTCACCG
251 CCGATGCTGC TCCAGGCTC ACCCAGGGT CCAACGTGCG CATATAGCGG
301 TCGTCCGGCA GCGAAGCGTC ACCCGTCGTC GGATGGGCCG CCTGGCGCTT
351 GACCGGGATG TGGGTGTGTT CGGGCACGTA AAACGTGCGA AACCCGTGGC
401 TTTCAGCAAG TCTGGCGGCC GCGGCCGGG TGATGCCGCG GTCGCTGGTG
451 AACAGCACA GTCCGTAGTG CATGCACCGA ATTAGAAGT GTTCCACCTG
501 CGCCGGGCAA GCGGCCGTCC AGTCGTTAAT GTCGCGAGCG CCGGTCGCTC
551 CCGCAGCGGC ACCCGAACGT GCGCTAGCGT GGTGATCGA ATCGCGTCGC
601 CCGGAGCACA GCGTCGCACT GCACCACTGG AGGAGCCATG ACCTACTCGC
651 CGGTAACCC CGGATACCCG CAAGCGCAGC CCGCAGGCTC CTACGGAGGC
701 GTCACACCTT CGTTCGCCCC CGCCGATGAG GGTGCGAGCA AGCTACCGAT
751 GTACCTGAAC ATCGCGGTGG CAGTGCTCGG CCTGGCTGCG TACTTCGCCA
801 GC

```

M. bovis 長さ : 628

下線を引いたヌクレオチドが *M. tuberculosis* を
M. bovis から鑑別するために使用されると推測される。

```

1 TCATAGCAGG CCTCCTCTTG GGTCCACAAC GCCCGCATCG CCTCGAGGTA
51 TTCGCGCAGC ATGGTGCGGC GCGGTCCGGG TGGCACACCA TGATCGACGA
101 GCTCGTCGGT GTTCCAGCCG AACCCGACCC CGACGCTGAC CCGGCCGTGC
151 GACAAATGAT CCAGCGTCGC AATGCTTTTC GCCAGCGTGA TCGGATCATG
201 CTCGACCGGC AGCGCCACCG CCGTGGCAAG CCGGATCCGC GACGTCACCG
251 CCGATGCTGC TCCAGGCTC ACCCAGGGT CCAACGTGCG CATATAGCGG
301 TCGTCCGGCA GCGAAGCGTC ACCCGCTGTC GGATGGGCCG CCTGGCGCTT
351 GACCGGGATG TGGGTGTGTT CGGGCACGTA AAACGTGCGA AACCCGTGGC
401 TTTCAGCAAG TCTGGCGGCC GCGGCCGGG TGATGCCGCG GTCGCTGGTG
451 AACAGCACA GTCCGTAGTG CATGCACCGA ATTAGAAGT GTTCCACCTG
501 CGCCGGGCAA GCGGCCGTCC AGTCGTTAAT GTCGCGAGCG CCGGTCGCTC
551 CCGCAGCGGC ACCCGAACGT GCGCTAGCGT GGTGATCGA ATCGCGTCGC
601 CCGGAGCACA GCGTCGCACT GCACCACT

```

【図3-5】

M. xenopi 長さ : 900

1 GTTCACCCAC CGCGAGCAAG CGCGCCCGGT AGAAGCTGCG ATGACACGCC
 51 AGTCGCGCGC AGACCCCGC CGCCAGGTGC GCTAGCGTGG ATGGTCGAAT
 101 CGCGTCGCAA CGCCTGCCCT GACNAGTAC GGCCTTAATG GAGCGGTCCA
 151 CGCAGCGTCG CGCGGAAGCG GCGCCCTGGG GATACAGCGT CGCAACACAG
 201 TGGCGCCOCA ACGGCACTGA TGCACAGGAG AAGCCATGAC GTACTCGCCC
 251 GGTAGCCCGG GATATCCACC CGCGCAGTCC CCCGGTTCCT ACGCGCGGTC
 301 CCCACAGTCG TTGCGCAAAAT CCGATGACGG CGCCAGCAAG CTGCAGCTGT
 351 ATCTGACCGT CGCGGTGGTG GCGCTCGGCC TGGCGGCCCTA CCTGGCGAGT

M. avium 長さ : 881

下線を引いたヌクレオチドが *M. avium* を
M. paratuberculosis から鑑別するために使用されると推測される。

1 TCGTAGCTGG CTTCCTCGTC GGTCCACAGC GCCCGCATCG CTTCAGGTA
 51 TTGCGCAGC ATGGTCCGGC GCGGCCCGC CGGCACGCC TGGTGCGGA
 101 GTTCGTGGT GTTCCAGCG AACCCGACGC CGAGGCTGAC CCGGCCGCG
 151 GACAGATGGT CAAGGGTGGC AATACTTTTC GCCAGCGTGA TCGGGTCGTG
 201 TTCGACCGGC AGGGCCACCG CGGTGGACAG CCGCACCCGC GAGGTGACGG
 251 CACAGGCCGC GCCCAGACTG ACCCAGGGT CCAGGGTGCG CATGTAGCGG
 301 TCGTCGGCA GCGACGCGTC GCGGTGGTC GGGTGCGCG CCTCCGCTT
 351 GATCGGGATA TCGGTGTGTT CCGGCACGTA GAAGGTGCA AACCCGTGGT
 401 CGTCGGCAAG CTTCGCGGCC GCAGCCGAG AGATGCCACG GTCGCTGGTG
 451 AAAAGCACA GCGCGTAATC CATGCACTGA ATTAGACGT GTTCTACCTC
 501 TCGCGGGCAA GCTGTCTGA TACGGACCGT CTCGCCCGC GGTCTCTCC
 551 GAAGCCCGC GCGACGCAA TGGCGACGC ACCGCGCGTC GCAGGTGCGC
 601 TAGCGTGGT GATCGACCGT GTCGCTCGCG CAGTGACGCG OCTGCAGCA
 651 CCGCGTCGA TCACAACCGT GCGGCCCGT CGGCACTAA AGGCAGTGA
 701 AGCAACAGGA GGAGCATGA CCTACTCTCC CGGCGGCCCG GATATCCAC
 751 CCGCGCAGTC TGGCGGCACC TATGCAGGCG CCACACATC TTTCGCCAAA
 801 GACGACGACG GCAAGAGCAA ACTCCGCTC TACCTCAACA TCGCCGTGGT
 851 CGCCCTGGGT TTGCGCGCT ACCTGCTGAA T

M. paratuberculosis 長さ : 707

1 TCGTAGCTGG CTTCCTCGTC GGTCCACAGC GCCCGCATCG CTTCAGGTA
 51 TTGCGCAGC ATGGTCCGGC GCGGCCCGC CGGCACGCC TGGTGCGGA
 101 GTTCGTGGT GTTCCAGCG AACCCGACGC CGAGGCTGAC CCGGCCGCG
 151 GACAGATGGT CAAGGGTGGC AATACTTTTC GCCAGCGTGA TCGGGTCGTG
 201 TTCGACCGGC AGGGCCACCG CGGTGGACAG CGCACCCGC GAGGTGACGG
 251 CACAGGCCGC GCCCAGACTG ACCCAGGGT CCAGGGTGCG CATGTAGCGG

【図3-6】

```

301 TCGTCGGGCA GCGACGCGTC GCGGTTGGTC GGGTGGCGCG CCTCCCGCTT
351 GATCGGGATA TCGTGTGTGT CCGGCACGTA GAAGGTCGCA AACCCGTGGT
401 CGTCGGCAAG CTTCCGGGCC GCAGCCGGAG AGATGCCACG STCGCTCGTG
451 AAAAGCACAA GCCCGTAATC CATGCAGTGA ATTAGAACGT GTTCTACCTC
501 TCGGGGGCAA GCTGTCTGTA TACGGACCGT CTCGCCGGCG GGTGCTCTGC
551 GAAGCCCGCG GCGAAGCCAA TGGCGACGGC ACCGGCCGTC GCACGTGCGC
601 TAGCGTGGGT GATCGACCGT GTCGCTCGCG CACTGACCGC CTTGCAAGCA
651 CCGCGTCGCA TCGCAACCGT GCGGCCCGCT CGGCACTRAAG AGGCAGTGGG
701 ACCAACA

```

M. merinum 長さ: 686

```

1 TCGTAGGGCG CTTCCTCTTG CGTCCACAGT CGCCCGCATC GCCTCGAGGT
51 ATTACGCAAC CATCGTGGCG CGCCGTCCGG GTGGACGCC ATGGTCGGCG
101 AGTTCTGTGG TGTTCGAACC GAACCCACG CCGAGGCTGA CCGTCCGCC
151 GCACAGATGA TCCAGCCTGG CAATGCTCTT GGCACGGCTG ATCGGTCAT
201 GCTCGACGGG CAGCGCCACC GCAGTCGACA GCGGTACCCG CGAGGTCACC
251 GCGATGCCG CGCCCAACT CAOCAGGGG TCCAGCCTGC GCATATAACG
301 ATCGTCGGGA AGCGAGGAAT CGCCGTCGT TGGATGAGCG GCTTCTCGCT
351 TGATTGGGAT ATGGGTGTGC TCAGGCACGT AGAAGCTGTG AAAGCCGTGG
401 TCGTCAGCGA GTCTCGCCG CGCGCCGGA GCGATGCCG GGTGCTGGT
451 GAAAAGCACA AGCCCATAGT CCATAACAGA ATTAGAACGT GTTCTACCTC
501 GCGCGGGCAA GCGCCGCCCG CGCCATCGG CTCGGCGGGA TCGACGGAGG
551 TGATGGCGCT GGTGAGCGG GGGCAGGTCG CCGCGGCGG AGCACCGGAA
601 CGTGCCTAG CGTGGTTGTT CGAATCGCGT CGCAGGGACC AAGCGTCGCA
651 ATGCAGCAGC GCGCCGCGA CGCGCGCAA GTAAACA

```

M. ulcerans 長さ: 685

下線部: *M. ulcerans* の数株間で配列変動あり。

図示されたスクレオナドは最も高頻度に見出されるものである。

```

1 TCGTAGGGCG CTTCCTCTTG CGTCACAGC GCCCGCATCG CCTCGAGGTA
51 TTCACGCAAC ATCGTGCGC GCGTCCGGG TGGAACGCCA TGGTCGGCGA
101 GTTCGTGGT GTTCCAACG AACCCACGC CGAGGCTGAC CCGTCCGCCG
151 GACAGATGAT CCAGCGTGGC AATGCTCTTG GCCAGGCTGA TCGGGTCATG
201 CTCGACGGGC AGCGCCACG CAGTCGACAG CCGTACCCGC GAGGTCACCG
251 CCGATGCCGC GCCAAACTC ACCAGGGGT CCAGCGTGGC CATATAACGA
301 TCGTCGGGAA GCGAGGAATC GCGCGTGTT GGAAGAGCGG CTTCTCGCTT
351 GATTGGGATA TGGGTGTGCT CAGGCACATA GAAGGTGTGA AAGCCGTGGT
401 CGTACCGAG TCTCGCCCGC GCGCCGGAG CGATGCCCGG GTCGCTGGTG
451 AAAAGCACAA GCCCATAGTC CATACAGAA TPAGAACGTC TTCTACCTCG

```

【図3-7】

501 GCCGGGCAAG CGCCCCCGGC GGCANTCGGC TTGGCGGGAT CGACGGAGGT
 551 GATGECGCTG GTCGAGCGGG GGCAGGTCGC CGCGCGCGA GCACCGGAAC
 601 GTCCGCTAGC GTGGTTCTTC GAA¹CGCGTC GCAGGACCA AGCGTCGCA
 651 TGCAGCAGCG GCGCGCGAC GCGCGCAAG TAACA

M. leprae 長さ : 729

1 TCATATAACG GCTTCATTCT TGTGTCCATA ATGCCTGCAT TGCTTCGAGG
 51 CATTCTGACA CCATGGTCCG GCGCCGCCCG GATGGCACAT CGTGATCGGT
 101 GAGCTCGTTG GTCTTCCAAC CGA¹CCCGAC GCGAAGTTC ACTCACTCGC
 151 CGGACAAATT ATCCAGCTTG ACAATACTTT TCGCAAGTGT GATTGGGTCA
 201 TGTTAGACGG GCAGCGCCAC CACCATGAAC AGTCGTAGCC TGCCGATATA
 251 ACCCGCATGT CCGGCCCAA CTTACCCATG AGTCATAGGT ACGCATCGCA
 301 TATAGCTGTC GTCAC¹TGGAC AGTGATACTC ATCCGTAACC AGGTAGTGGG
 351 GTCTGAGTGG CAATGGCATA TGGGTGTGTT CGGGCACATA GAAC¹TTCGG
 401 AAGCCGTGGC TC¹CCGCAAG CTGACTGCT GCCCGGGGG TGATGCCCG
 451 GTCGTTGGTT AAAAGCGCAA TCCCGTAGCC CATACCAAGA ATTTAGAGCG
 501 TGTTCCACCT GCGACGCCA AGCGGTCTGT CCGACGATT CGGCCTCAT
 551 CGGTGGTAGG CGAGCTGACA CGCAGTCTGT GCCGGCGCGG TGCCCTAAC
 601 GTCCGCTAGC GTTGATGATC GAATGCGCGC CAACGTAAAC GCTGCCAATT
 651 TGGGCGTTTA TCCAACGGTG CGCATGGGAG CACAGCGTTG CACTGCAGCA
 701 GTGGCGCCGT GACGGCACTG GAAATAACA

Sequence F57 *M. paratuberculosis*

M. paratuberculosis (F57) 長さ : 618

1 GATCTCAGAC AGTGGCAGGT GCGGCTCCG AAGCTGGCGT CAGCTATTCC
 51 TGTACCGAAT GTTGTGTCA CCGAGCCGGT OCCAGGTGTG TTCGAGTTGC
 101 AGCTGAGAAT TGTGATCCG CTTAGTTCCG CGCTTGAATG GTCTCTGTG
 151 CCAGCCGCC ACTCGTGGTC TCTGAGTTG GGTATCGATG AATGGGCGT
 201 CTACCAATCG CTCCTGTTGG CGAACGTATC GGGCGTTGTA GTGGGAGCG
 251 TAOCAGGGTC GGGGAAACC GCGTGGCTGA CGAGTGTCTT GGGTCTGTC
 301 GGTGCTCAG CGCGGTCCA GTTCGCTGTC ATCGACGGGA AGGTGGTCA
 351 GGACTTGAA TGCTTGGTG CTCGTAGCTG CCGATTGATG AATGACGATC
 401 TGGAGCTGCC TGAGATTGCA GCGATTCTGA ATGACGCGAC CGGTCTAGTC
 451 CGTGATCGAA TTAGACAGGG CAACAACATA TTCGGATCGT CCACTTTTG
 501 GGATCGCGGC CCGACCGCC AGTTTCGGCT GGTCTTCCTG CTGATTGAGC
 551 AGTGCCAAGC GTTCCTGGAC CCGCGCCAGT TGGTGACGAA GGAGAGGAAA
 601 GCTATCGGG CCGAGATC

【図3-8】

バリデーションを行っていない配列

M. scrofulaceum Length: 219

```

1 GTTCTACCTC CGGTGAGCAA GCTGCCGCCG CGGCGGCACG GATCGGCGTC
51 CAAGCCGGTC GCGACGGCAC GCCCGTCCCG AAGTGCCTA GCGTGGTTGA
101 TCGATCGCGT CGCAACGCAA CCGCCGGGCA CGGCATTCTG GGAACGGCGC
151 GCCCGCACGC ACAGCGCCGC GACGCAACTG TGGCGCCGC AAAGGCACTT
201 CACGGCACTG GAAGCAACA

```

M. nonchromogenicum Length: 129

```

1 GTTCTGTTC GCGGGGCAAC GGGGGGTCC TTGTCGCGCA GTGTTGACCC
51 ACCGACTCGG CCCGCAAGTG CGTAGCGTG GATGGTCGAA GCGCGCCGCA
101 CCGCCACCA GCGCCCTGCC ACAAGCACA

```

M. triplex Length: 116

```

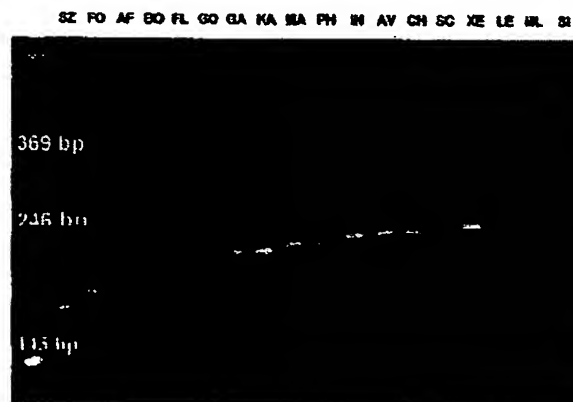
1 GTTCTACCTT GGTGCGCAAG CGGCGCGGGA ACGGCCCGG CACCGGCTCC
51 CCGACGTGCG CTAGCGTGGT TGTTGGAATC GCGTCGCAAC GCAAGCGCGG
101 CGAGCCTGGA AAAACA

```

【図4】

Figure 4.

異なるマイコバクテリア種のu s - p 3 4領域のU 1 - U 4 コンセンサス増幅



SZULGAI : 163 pb

FORTUITUM : 177 pb

AFRICANUM : 178 pb

BOVIS / TUB. : 178 pb

FLAVESCENS : 178 pb

GORDONAE : 182 pb

GASTRI : 223 pb

KANSASH : 225 pb

MIARNUM : 236 pb

PHLEI : 238 pb

INTRACELLULARE : 255 pb

AVUM / PARATUB. : 257 pb

CHELONAE : 258 pb

SCROFULACEUM : 259 pb

XENOPH : 265 pb

LEPRAE : 269 pb

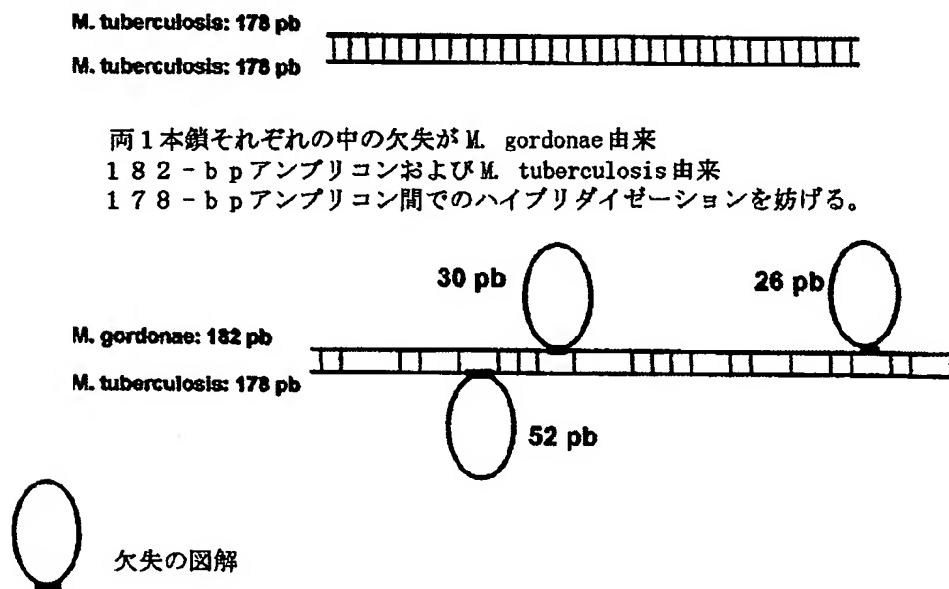
MAIMOENSE : 280 pb

SIRAE : 288 pb

【図5】

Figure 5. 特異的および非特異的ハイブリダイゼーション

M. tuberculosis 由来両 178 - b p アンプリコン間での相同ハイブリダイゼーション



【図8-4】

```

721
{mycAV21} .cgtggcgcc cgctcggcac taaaaggcag tggaagcaac a----g-gcc ----c---t
{mycPT22} .cgtggcgcc cgctcggcac taaaaggcag tggaagcaac a----g-gcc ----c---t
{mycML22} gcgtcgc... ..tgagggtc ttgaaggcac tggaagcaat a----g-gcc ----c---t
{mycSI22} acgtcgcgcc cgacgaggtc ttgaaggcac tggaagcaac a----g-gcc ----c---t
{mycTB21} ..... t----g-gcc ----c---t
{mycB022} ..... t----g-gcc ----c---t
{mycMA22} gcgccgcgac ggcgc..... .gcaagtaac a----g-gcc ----c---t
{mycUL22} gcgccgcgac ggcgc..... .gcaagtaac a----g-gcc ----c---t
{mycGA32} tcgcattgca gcaggcg.ta gcgacggcac cggaggtaac a----g-gcc ----c---t
{mycKA31} tcgcattgca gcaggcg.ta gcgacggcac cggaggtaac a----g-gcc ----c---t
{mycGO31} ggcccggtgac ggcaccg... ..gaagcaa.c a----g-ctt ----c---c
{mycSZ31} gcaccggaaa gcaaccg... ..gaagtaatc a----g-gcc ----c---t
{mycLE22} gcgccgtgac .....ggcac tggaaataac a----g-gcc ----c---t
{mycIN42} ccgcggcgcc cgctcggcac ttaaaggcac tggtagcaac a----g-gcc ----c---t
{mycXE41} ggcgccccaa cggcact... ..gatgcac a----a-gcc ----g---t
Consensus -----GCAG-A--- ATGAC-TAC-

```

```

781
{mycAV21} -
{mycPT22} -
{mycML22} -
{mycSI22} -
{mycTB21} -
{mycB022} -
{mycMA22} -
{mycUL22} -
{mycGA32} -
{mycKA31} -
{mycGO31} -
{mycSZ31} -
{mycLE22} -
{mycIN42} -
{mycXE41} -
Consensus C

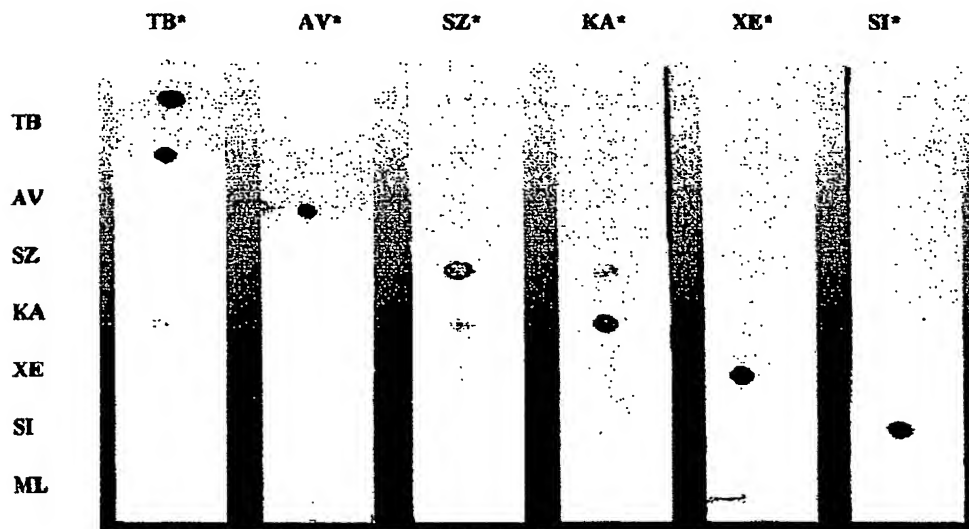
```

【図6】

Figure 6.

種特異的マイコバクテリアプローブを開示する、マイコバクテリア標的アンプリコンのナイロン膜上におけるディファレンシャル逆ハイブリダイゼーション。

- a) 種々のマイコバクテリア種に特異的な非標識増幅DNAセグメントをまずナイロン膜上に移した (*M. tuberculosis* (TB)、*M. avium* (AV)、*M. szulgai* (SZ)、*M. kansasii* (KA)、*M. xenopi* (XE)、*M. simiae* (SI) および *M. malmoense* (ML))。
- b) *M. tuberculosis* (TB*), *M. avium* (AV*), *M. szulgai* (SZ*), *M. kansasii* (KA*), *M. xenopi* (XE*) および *M. simiae* (SI*) 由来のジデオキシゲニン標識アンプリコンをナイロン膜上でハイブリダイズさせた。特異的ディファレンシャルハイブリダイゼーションが得られている。



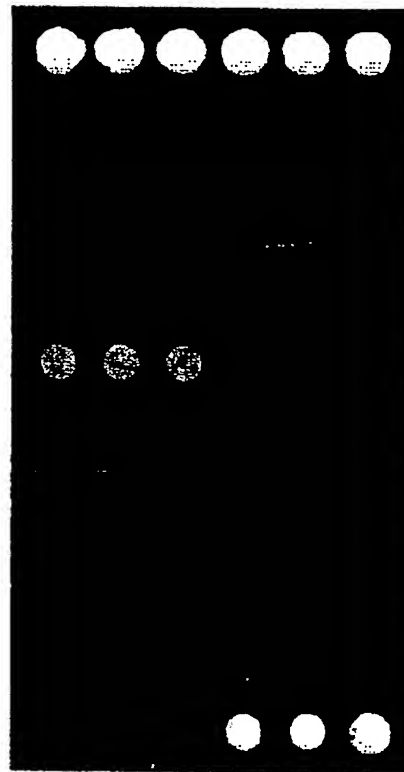
【図7】

Figure 7.

M. gordonae を特異的に検出するバイオチップの例

固定化対照

ハイブリダイゼーション対照



【図8-1】

Figure 8.

いくつかのマイコバクテリアのu s - p 3 4の配列のアラインメント

	1					60
{mycAV21}	tcgtag.ctg	gcttctctct	cggtccacag	.cgcccgcat	cgcttccagg	tattcgcgca
{mycPT22}	tcgtag.ctg	gcttctctct	cggtccacag	.cgcccgcat	cgcttccagg	tattcgcgca
{mycML22}	tcgtag.gcc	gcttctctct	gggtccacag	.cgcccgcat	tgcttcgatg	tattcgcgca
{mycSI22}	tcgtat.tgg	gcttctctct	cggtccacag	.cgcccgcat	ggcttccagg	tattcgcgca
{mycTB21}	tcatag.cag	gcctctctct	gggtccaca	acgcccgcac	cgcttcgagg	tattcgcgca
{mycB022}	tcatag.cag	gcctctctct	gggtccaca	acgcccgcac	cgcttcgagg	tattcgcgca
{mycMA22}	tcgtag.gcg	gcttctctct	cggtccacag	tcgcccgcac	cgcttcgagg	tattcgcgca
{mycUL22}	tcgtag.gcg	gcttctctct	cggtccacag	.cgcccgcat	cgcttcgagg	tattcgcgca
{mycGA32}	gtg.....cgccgg	cgcccgcg	gcacgccatg
{mycKA31}	gtg.....cgccgg	cgcccgcg	gcacgccatg
{mycGO31}	gtg.....cgccgg	cgcccgcg	gcacgccatg
{mycS231}	gtg.....cgccgg	cgcccgcg	gcacgccatg
{mycLE22}	tcataaacg	gcttcattct	tgtgtccata	atgcctgcac	tgcttcgagg	cattcgtaca
{mycIN42}	gt.....
{mycXE41}	gt.....
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	61					120
{mycAV21}	gcattggtgcg	gcgcgggccc	gcccgcacgc	cgt-gtcggc	gagtt-gtc-	--gttccagc
{mycPT22}	gcattggtgcg	gcgcgggccc	gcccgcacgc	cgt-gtcggc	gagtt-gtc-	--gttccagc
{mycML22}	gcattggtgcg	acggcgcccg	gcccgcacgc	cgt-gtcggc	gagtt-gtc-	--gttccagc
{mycSI22}	gcattggtgcg	ccggcgcccg	gcccgcacgc	tgt-gtcggc	gagtt-gtc-	--gttccagc
{mycTB21}	gcattggtgcg	gcgcgggccc	gcccgcacgc	cat-atcgac	gagtt-gtc-	--gttccagc
{mycB022}	gcattggtgcg	gcgcgggccc	gcccgcacgc	cat-atcgac	gagtt-gtc-	--gttccagc
{mycMA22}	acatcggtgcg	gcgcgggccc	gcccgcacgc	cat-gtcggc	gagtt-gtc-	--gttccagc
{mycUL22}	acatcggtgcg	gcgcgggccc	gcccgcacgc	cat-gtcggc	gagtt-gtc-	--gttccagc
{mycGA32}	gtcggcgaggt	tcgtgcgcgc	gcccgcacgc	cat-gtcggc	gagtt-gtc-	--gttccagc
{mycKA31}	cat-gtcggc	gagtt-gtc-	--gttccagc
{mycGO31}	cat-gtcggc	gagtt-gtc-	--gttccagc
{mycS231}	cat-gtcggc	gagtt-gtc-	--gttccagc
{mycLE22}	ccattggtgcg	gcgcgggccc	gcccgcacgc	cgt-atcgac	gagtt-gtc-	--gttccagc
{mycIN42}	cgt-atcgac	gagtt-gtc-	--gttccagc
{mycXE41}	cgt-atcgac	gagtt-gtc-	--gttccagc
Consensus	-----	-----	-----	---G-----	---G-----	---G-----
	121					180
{mycAV21}	-gaacc-gac	gcccagggctg	acccggccgc	cggacagatg	gtcaagggtg	g-aatacttt
{mycPT22}	-gaacc-gac	gcccagggctg	acccggccgc	cggacagatg	gtcaagggtg	g-aatacttt
{mycML22}	-aaacc-aac	gcccagggctg	acccggccgc	cggacagatg	gtcaagggtg	g-aatacttt
{mycSI22}	-gaacc-gac	gcccagggctg	acccggccgc	cggacagatg	gtcaagggtg	g-aatacttt
{mycTB21}	-gaacc-gac	cccagggctg	acccggccgc	gcccagggctg	gtcaagggtg	g-aatacttt
{mycB022}	-gaacc-gac	cccagggctg	acccggccgc	gcccagggctg	gtcaagggtg	g-aatacttt
{mycMA22}	-gaacc-gac	gcccagggctg	acccggccgc	cggacagatg	gtcaagggtg	g-aatacttt
{mycUL22}	-gaacc-gac	gcccagggctg	acccggccgc	cggacagatg	gtcaagggtg	g-aatacttt
{mycGA32}	-gaacc-gac	gcccagggctg	acccggccgc	cggacagatg	gtcaagggtg	g-aatacttt
{mycKA31}	-gaacc-gac	gcccagggctg	acccggccgc	cggacagatg	gtcaagggtg	g-aatacttt
{mycGO31}	-gaacc-gac	gcccagggctg	acccggccgc	cggacagatg	gtcaagggtg	g-aatacttt
{mycS231}	-gaacc-gac	gcccagggctg	acccggccgc	cggacagatg	gtcaagggtg	g-aatacttt
{mycLE22}	-gaacc-gac	gcccagggctg	acccggccgc	cggacagatg	gtcaagggtg	g-aatacttt
{mycIN42}	-cgtct-gcc	ggaggggccc	cgccggccgcgccc	C-caagacacg
{mycXE41}	-gatga-acg	ccagtcgccc	cgccggccgcgccc	C-aggtgccc
Consensus	-C-----	-----	-----	-----	-----	-C-----
	181					240
{mycAV21}	-c--cagcgt	gacg-gg--g	t-ttcgacgg	gcaggggccac	cgccggggac	agccgcaccc
{mycPT22}	-c--cagcgt	gacg-gg--g	t-ttcgacgg	gcaggggccac	cgccggggac	agccgcaccc
{mycML22}	-c--cagcgt	gacg-gg--g	t-ttcgacgg	gcaggggccac	cgccggggac	agccgcaccc
{mycSI22}	-c--cagcgt	gacg-gg--g	t-ttcgacgg	gcaggggccac	cgccggggac	agccgcaccc
{mycTB21}	-c--cagcgt	gacg-gg--g	t-ttcgacgg	gcaggggccac	cgccggggac	agccgcaccc
{mycB022}	-c--cagcgt	gacg-gg--g	t-ttcgacgg	gcaggggccac	cgccggggac	agccgcaccc
{mycMA22}	-g--cagcgt	gacg-gg--g	t-ttcgacgg	gcaggggccac	cgccggggac	agccgcaccc
{mycUL22}	-g--cagcgt	gacg-gg--g	t-ttcgacgg	gcaggggccac	cgccggggac	agccgcaccc
{mycGA32}	-g--cagcgt	gacg-gg--g	t-ttcgacgg	gcaggggccac	cgccggggac	agccgcaccc
{mycKA31}	-g--cagcgt	gacg-gg--g	t-ttcgacgg	gcaggggccac	cgccggggac	agccgcaccc
{mycGO31}	-c--cagcgt	gacg-gg--g	t-ttcgacgg	gcaggggccac	cgccggggac	agccgcaccc
{mycS231}	-c--cagcgt	gacg-gg--g	t-ttcgacgg	gcaggggccac	cgccggggac	agccgcaccc
{mycLE22}	-c--cagcgt	gacg-gg--g	t-ttcgacgg	gcaggggccac	cgccggggac	agccgcaccc
{mycIN42}	-c--cagcgt	gacg-gg--g	t-ttcgacgg	gcaggggccac	cgccggggac	agccgcaccc
{mycXE41}	-a--gtggat	gggc-aa--g	c-tcgcaacg	cctggccc...
Consensus	T-GC-----	-----G--TC-	-G-----	-----	-----	-----

【圖8-2】

	241					300
{mycAV21}	.gcgaggtga	cggcacaggc	cgcgccaga	ctgaccacg	ggtccagggtgcgca
{mycPT22}	.gcgaggtga	cggcacaggc	cgcgccaga	ctgaccacg	ggtccagggtgcgca
{mycML22}	.gcgacgtca	cggcgacgc	cgcgccagg	ctcaccacg	ggtctagcgtgcgca
{mycS122}	.gcgaggtga	cgcgcacgc	cgcgccaga	ctgaccacg	ggtccagcgtgcgca
{mycTB21}	.gcgacgtca	cgcgcagtc	tgctccagg	ctcaccacg	ggtccaacgtgcgca
{mycB022}	.gcgacgtca	cgcgcagtc	tgctccagg	ctcaccacg	ggtccaacgtgcgca
{mycMA22}	.gcgaggtga	cgcgcagtc	cgcgccaaa	ctcaccacg	ggtccagcgtgcgca
{mycUL22}	.gcgaggtga	cgcgcagtc	cgcgccaaa	ctcaccacg	ggtccagcgtgcgca
{mycGA32}	.gggaggtga	cgcctgaagc	cgcaccaag	ctcaccacg	ggtccagggtgcgca
{mycKA31}	.gggaggtga	cgcctgaagc	cgcgccaaa	ctcaccacg	ggtccagcgtgcgca
{mycG031}	.gcgacgtca	cgcgcacgc	cgcgccagg	ctcaccacg	ggtccagggtgcgca
{mycS231}	.gagacgtca	cgcgcggcg	agcacccaa	ctcaccacg	ggtccagcgtgcgca
{mycLE22}	tgccgataa	acccgcagt	cgcgccaaa	cttaccatg	agtcatagt	acgcatacga
{mycIN42}
{mycXE41}
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	301					360
{mycAV21}	tgtacgggtc	gtcgggc.ag	cga.cgcgtc	gccggtggtc	gggtgcgcgg	cctccccgtt
{mycPT22}	tgtacgggtc	gtcgggc.ag	cga.cgcgtc	gccggtggtc	gggtgcgcgg	cctccccgtt
{mycML22}	tgtacgggtc	gtcgggc.ag	cga.cgcgtc	gccggtggtc	gggtgcgcgg	cctccccgtt
{mycS122}	tgtacgggtc	gtcgggc.ag	cga.cgcgtc	gccggtggtc	gggtgcgcgg	cctccccgtt
{mycTB21}	tgtacgggtc	gtcgggc.ag	cga.cgcgtc	gccggtggtc	gggtgcgcgg	cctccccgtt
{mycB022}	tgtacgggtc	gtcgggc.ag	cga.cgcgtc	gccggtggtc	gggtgcgcgg	cctccccgtt
{mycMA22}	tgtacgggtc	gtcgggc.ag	cga.cgcgtc	gccggtggtc	gggtgcgcgg	cctccccgtt
{mycUL22}	tgtacgggtc	gtcgggc.ag	cga.cgcgtc	gccggtggtc	gggtgcgcgg	cctccccgtt
{mycGA32}	tgtacgggtc	gtcgggc.ag	cga.cgcgtc	gccggtggtc	gggtgcgcgg	cctccccgtt
{mycKA31}	tgtacgggtc	gtcgggc.ag	cga.cgcgtc	gccggtggtc	gggtgcgcgg	cctccccgtt
{mycG031}	tgtacgggtc	gtcgggc.ag	cga.cgcgtc	gccggtggtc	gggtgcgcgg	cctccccgtt
{mycS231}	tgtacgggtc	gtcgggc.ag	cga.cgcgtc	gccggtggtc	gggtgcgcgg	cctccccgtt
{mycLE22}	tgtacgggtc	gtcgggc.ag	cga.cgcgtc	gccggtggtc	gggtgcgcgg	cctccccgtt
{mycIN42}
{mycXE41}
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	361					420
{mycAV21}	gatcgggata	tgcgtgtgtt	cgggcacgta	gaaggtcgca	aacc-gtgg	cgtcggcaaa
{mycPT22}	gatcgggata	tgcgtgtgtt	cgggcacgta	gaaggtcgca	aacc-gtgg	cgtcggcaaa
{mycML22}	gatcgggata	tgcgtgtgtt	cgggcacgta	gaaggtcgca	aacc-gtgg	cgtcggcaaa
{mycS122}	gatcgggata	tgcgtgtgtt	cgggcacgta	gaaggtcgca	aacc-gtgg	cgtcggcaaa
{mycTB21}	gatcgggata	tgcgtgtgtt	cgggcacgta	gaaggtcgca	aacc-gtgg	cgtcggcaaa
{mycB022}	gatcgggata	tgcgtgtgtt	cgggcacgta	gaaggtcgca	aacc-gtgg	cgtcggcaaa
{mycMA22}	gatcgggata	tgcgtgtgtt	cgggcacgta	gaaggtcgca	aacc-gtgg	cgtcggcaaa
{mycUL22}	gatcgggata	tgcgtgtgtt	cgggcacgta	gaaggtcgca	aacc-gtgg	cgtcggcaaa
{mycGA32}	gatcgggata	tgcgtgtgtt	cgggcacgta	gaaggtcgca	aacc-gtgg	cgtcggcaaa
{mycKA31}	gatcgggata	tgcgtgtgtt	cgggcacgta	gaaggtcgca	aacc-gtgg	cgtcggcaaa
{mycG031}	gatcgggata	tgcgtgtgtt	cgggcacgta	gaaggtcgca	aacc-gtgg	cgtcggcaaa
{mycS231}	gatcgggata	tgcgtgtgtt	cgggcacgta	gaaggtcgca	aacc-gtgg	cgtcggcaaa
{mycLE22}	gatcgggata	tgcgtgtgtt	cgggcacgta	gaaggtcgca	aacc-gtgg	cgtcggcaaa
{mycIN42}
{mycXE41}
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----C-----	-----G-----
	421					480
{mycAV21}	cttcg-ggcc	gcagccgga-	agatgccca-g	gtcgctggtg	aaaagca-aa	gc-cgtaatc
{mycPT22}	cttcg-ggcc	gcagccgga-	agatgccca-g	gtcgctggtg	aaaagca-aa	gc-cgtaatc
{mycML22}	cttcg-ggcc	gcagccgga-	agatgccca-g	gtcgctggtg	aaaagca-aa	gc-cgtaatc
{mycS122}	cttcg-ggcc	gcagccgga-	agatgccca-g	gtcgctggtg	aaaagca-aa	gc-cgtaatc
{mycTB21}	cttcg-ggcc	gcagccgga-	agatgccca-g	gtcgctggtg	aaaagca-aa	gc-cgtaatc
{mycB022}	cttcg-ggcc	gcagccgga-	agatgccca-g	gtcgctggtg	aaaagca-aa	gc-cgtaatc
{mycMA22}	cttcg-ggcc	gcagccgga-	agatgccca-g	gtcgctggtg	aaaagca-aa	gc-cgtaatc
{mycUL22}	cttcg-ggcc	gcagccgga-	agatgccca-g	gtcgctggtg	aaaagca-aa	gc-cgtaatc
{mycGA32}	cttcg-ggcc	gcagccgga-	agatgccca-g	gtcgctggtg	aaaagca-aa	gc-cgtaatc
{mycKA31}	cttcg-ggcc	gcagccgga-	agatgccca-g	gtcgctggtg	aaaagca-aa	gc-cgtaatc
{mycG031}	cttcg-ggcc	gcagccgga-	agatgccca-g	gtcgctggtg	aaaagca-aa	gc-cgtaatc
{mycS231}	cttcg-ggcc	gcagccgga-	agatgccca-g	gtcgctggtg	aaaagca-aa	gc-cgtaatc
{mycLE22}	cttcg-ggcc	gcagccgga-	agatgccca-g	gtcgctggtg	aaaagca-aa	gc-cgtaatc
{mycIN42}
{mycXE41}
Consensus	-----C-----	-----G-----	-----C-----	-----C-----	-----C-----	-----C-----

【図8-3】

	481				540
{mycAV21}	-atgcagtg	a.ttagaacg	tgttctacct	ctgcggggca	agctgtcgtg atacggaccg
{mycPT22}	-atgcagtg	a.ttagaacg	tgttctacct	ctgcggggca	agctgtcgtg atacggaccg
{mycML22}	-atggacaga	a.ttagaacg	tgttctacct	gcggtgggca	agccgctgcg ccgcccaggga
{mycSI22}	-atgcacaga	a.ttagaacg	tgttctacct	ctgtggagca	agcggccccc gctacgtcga
{mycTB21}	-atgcaccga	a.ttagaacg	tgttccacct	gcgcccggca	agcggccc...
{mycB022}	-atgcaccga	a.ttagaacg	tgttccacct	gcgcccggca	agcggccc...
{mycNA22}	-at.aacaga	a.ttagaacg	tgttctacct	cggcccggca	agcggccccc gcgccaatcg
{mycUL22}	-at.aacaga	a.ttagaacg	tgttctacct	cggcccggca	agcggccccc gcgccaatcg
{mycGA32}	-atgaacaga	a.ttagaacg	tgttctacct	cggcccggca	agcggctcat ctgcga...
{mycKA31}	-atgaacaga	a.ttagaacg	tgttctacct	cagcccggca	agcggctcat ccgcccagcg
{mycG031}	-atgcccaca	t.ttagaacg	tgttctacct	ttggccg...
{mycS231}	-atgcaccga	a.ttagaacg	tgttctacct	ctgcgat...
{mycLE22}	-ataccaaga	atttagagcg	tgttccacct	gcgacggcca	agcggctcgtg ccgacgattt
{mycIN42}	-atgcagcga	atttagaacg	tgttccacct	tgctgagcaa	gctccgggtga taccagaccgt
{mycXE41}	-atgcagcgc	gaattagaac	ggttcaccca	ccgcccggca	gcggccggc...
Consensus	C-----	-----	-----	-----	-----
	541				600
{mycAV21}	tctcggccg	cggtcgtct	ccgaagccc	cgggcaagcc aatggcgacg
{mycPT22}	tctcggccg	cggtcgtct	ccgaagccc	cgggcaagcc aatggcgacg
{mycML22}	tctcgaactc	gaccacacac	actggtcggc	gccgggcgcg	ccgacaggtc ggtcggcccg
{mycSI22}	cccgagacg	ggcgcgtgag	ac.gatcgct	cctggtcgcg	cctaggggccc ggtcgtccc
{mycTB21}	gtccag	tcttaattgt	cggagagccc ggtcgtccc
{mycB022}	gtccag	tcttaattgt	cggagagccc ggtcgtccc
{mycMA22}	gctcggcggg	atc...gac	ggaggtgatg	gcgctgggtc	agcgggggca ggtcggcccg
{mycUL22}	gcttggcggg	atc...gac	ggaggtgatg	gcgctgggtc	agcgggggca ggtcggcccg
{mycGA32}	tcggcagcgg	tgccggg	gcgggtatcg	cgggcgggcaa ggtcggcccg
{mycKA31}	tcggcagcgg	tgccggg	gcgggtatcg	cgggcgggcaa ggtcggcccg
{mycG031}ca	gccgacc	cctcgggcg	acggggcacta gttgtcacag
{mycS231}ga	gcaagcg	gcccggtcgg	ccgacgagca ggtcggcccg
{mycLE22}	cgccgtcc...	atcggt	ggtagggcag	ctgacacgca ggtcgtgccc
{mycIN42}	ctcggccggagg	ggccg	ccggggggcct	cgctcgcccaa gacagtgggc
{mycXE41}gta	gaagctcga	tgacacgcca	gtcggccgca	gaccccccgc gccaggtgccc
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----
	601				660
{mycAV21}	gcacgggccc	tcgcacgtgc	gttagcgtgg	gtgatcgacc	gtgtcgc...
{mycPT22}	gcacgggccc	tcgcacgtgc	gttagcgtgg	gtgatcgacc	gtgtcgc...
{mycML22}	gcacgggccc	ccgaacgtgc	gttagcgtgg	gtgatcgacc	gcgtcgcaac gcaagatctc
{mycSI22}	gcgcaccgac	tcgaacgtgc	gttagcgtgg	ttgatcggtc	gcg.cgtaac gcaaacggcg
{mycTB21}	gcagcgccac	ccgaacgtgc	gttagcgtgg	ttgatcgga...
{mycB022}	gcagcgccac	ccgaacgtgc	gttagcgtgg	ttgatcgga...
{mycNA22}	gcgcgagcac	ccgaacgtgc	gttagcgtgg	ttgttcga...
{mycUL22}	gcgcgagcac	ccgaacgtgc	gttagcgtgg	ttgttcga...
{mycGA32}	gcgtgagtac	ccggccgtgc	gttagcgtgg	gtcatcga...
{mycKA31}	gcgcgagcac	ccggccgtgc	gttagcgtgg	gtcatcga...
{mycG031}	gtgcgctagc	gtggttgatc	gaatgcgtgc	cagggccgt...
{mycS231}	gcgcgaccag	cagaacgtgc	gttagcgtgg	ttgatcga...
{mycLE22}	gcgcgggtgc	cctaacgtgc	gttagcgtgg	atgatcga...
{mycIN42}	gcgcacacgg	ttccgcacgc	tgctgtagcg	tggttgat...
{mycXE41}	ctagcgtgga	tggtcgaatc	gcgtcgcaac	gcctgccctg	acaagtcacg gcgttaattg
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----
	661				720
{mycAV21}	tcgcgc	agtgacgcgc	ctgcaagcac	cgctcgcgat cgcaac...
{mycPT22}	tcgcgc	agtgacgcgc	ctgcaagcac	cgctcgcgat cgcaac...
{mycML22}	gaaggtgttt	tcaaaaggcg	cgcg....c	ctggaagtcg	agcgtcgcgc cgcaaatgcg
{mycSI22}	gcacgccctg	gcgtcaccca	cgggcgagcc	ctgcagacac	ggcgtcgcaac tgcagcagtg
{mycTB21}	atcgcgctcg	ccgggagcac	agcgtcgcaac	tgcaaccag..
{mycB022}	atcgcgctcg	ccgggagcac	agcgtcgcaac	tgcaaccag..
{mycNA22}	atcgcgctcg	cagggacca.	agcgtcgcaa	tgcaagcagcg
{mycUL22}	atcgcgctcg	cagggacca.	agcgtcgcaa	tgcaagcagcg
{mycGA32}	at	tggttcgcag ggagcaatcg
{mycKA31}	at	cgtgtcgcaag ggagcaatcg
{mycG031}	ac	cgctcgcgtc cgcaagcagag
{mycS231}	gt	cgc.....
{mycLE22}	cca.atttgg	gcgtttatcc	aacgggtgcgc	atgggagcac	agcgtttgcac tgcagcagtg
{mycIN42}cg	acgcgctgcg	aatgcggtga	cgcccgctgca	agcacagcgt cgcacgcgca
{mycXE41}	agcgggtccac	gcagcgtcgc	gcgggaagcg	cgccctgggg	atacagcgtc gcaacacagt
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/566

33/569

識別記号

F I

C 1 2 R 1:32)

(C 1 2 Q 1/68

ノート (参考)

A

//(C12N 15/09 ZNA
C12R 1:32)
(C12Q 1/68
C12R 1:32)

C12R 1:32)
C12N 15/00 ZNAA
F
C12R 1:32)

(72)発明者 パスカル・ヴァンヌッフェル
ベルギー--7133ビュヴリーヌ、リュ・ド
ウ・ラ・パサージュ・エジプト138番

Fターム(参考) 4B024 AA13 CA01 CA09 HA14
4B029 AA21 AA23 BB20 CC03
4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ42 QR08
QR32 QR39 QR56 QR62 QR84
QS14 QS25 QS34 QS39 QX01

【 外国語明細書 】

TITLE OF INVENTION

Identification of nucleotide sequences specific for mycobacteria and
development of differential diagnosis strategies for mycobacterial species.

DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION5 Fields of the invention.

The present invention refers to new genetic sequences, diagnostic and/or quantification
methods and devices using said sequences for the identification of various types of
Mycobacteria strains

10

Background.

The mycobacterial diseases may be divided in three categories: tuberculosis which is caused
15 either by *M. tuberculosis* or *M. bovis*, both belonging to the *M. tuberculosis*-complex (TUB),
leprosy caused by *M. leprae*, and diseases caused by nontuberculous mycobacteria (NTM),
which cause all mycobacterial diseases other than tuberculosis and leprosy. Historically,
tuberculosis and leprosy are the two preponderant human mycobacterial diseases. In recent
years however, NTM have become more frequent in developed countries, partly because of
20 the development of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) (1). Tuberculosis occurs
only in humans and animals, no other reservoir has been found to date. Conversely, the
reservoir of mycobacteria responsible for NTM disease is mainly environmental and the
majority of these mycobacteria are naturally resistant to known antimycobacterial drugs,
making eradication unfeasible. Identification of mycobacteria species by rapid and specific
25 methods is now mandatory. In particular, there is a need for rapid differentiation of strict
human and animal pathogenic mycobacteria (such as, for example, *M. tuberculosis*-complex,
M. paratuberculosis, *M. leprae*) from potentially pathogenic mycobacteria (such as, for
example, *M. avium*-complex; *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. malmoense*)
and from normally saprophytic species (such as, for example, *M. goodii*; *M. terrae*; *M.*
30 *nonchromogenicum*; *M. flavescentis*; *M. gastri*; *M. smagmatica*). Except for the strict
pathogens, the majority of mycobacteria can indeed be found everywhere in the nature (soil,
fresh and seawater) and can colonize temporary or permanently the human respiratory or
digestive tract after ingestion or inhalation.

Classification

a) Members of the tuberculosis-complex (TUB):

- This group comprises *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*.

b) Non tuberculous mycobacteria (NTM):

- Members of the *M. avium*-complex (MAC-complex) includes several environmental species that resemble *M. avium* and *M. intracellulare* or that have intermediate characteristics common to these species (*M. avium*; *M. intracellulare*; *M. paratuberculosis*, *M. scrofulaceum*).
- Mycobacteria other than TUB (also named MOTT) and not belonging to the MAC-complex (such as, for example, *M. mageritense*, *M. szulgai*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. chelonae*, *M. simiae*, *M. marinum*, *M. goodii*, *M. fortuitum*).

Introduction

Tuberculosis infects one-third of the world's population and kills more than 3 million of people each year. Tuberculosis, caused by mycobacteria of the *M. tuberculosis* group (TUB), is still highly endemic in large parts of the world and also the potential for introduction into and further transmission within countries where it has become rare (2). Tuberculosis has indeed reemerged in many industrialized nations in recent years as a result of AIDS and changing population dynamics characterized by increased numbers of migrant workers, immigrants, and homeless people (3). Of particular concern is the spread of drug-resistant strains (4). Cases of tuberculosis are more and more often difficult to treat because of the increasing prevalence of TUB strains that are resistant to all front-line antituberculous drugs. In HIV-1 infected people, TUB is the most common opportunistic bacterial infection. In advanced stages of AIDS, mycobacterial infections due to members of the *M. avium*-*intracellulare* complex (MAC) are the most common systemic bacterial opportunistic infection (1). Moreover, reduced and compromised immune function as found in newborns, infants, and immuno-suppressed individuals allows opportunistic infections caused by mycobacteria other than *M. tuberculosis* (NTM) including *M. avium*-*intracellulare*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. scrofulaceum*, and *M. szulgai*.

The increasing number of mycobacterial infections has made it clinically important to quickly identify mycobacteria at the species level. The diagnosis of a pathogenic versus a non-pathogenic species not only has epidemiological implications but is also relevant to the demands of patient management. Individuals with highly contagious infections may be

isolated to prevent the spread of the disease. As a matter of fact, antibiotic treatments may vary according to the species encountered. Today, the number of non-tuberculous infections is difficult to assess because there is no system for notification as it exists for *M. tuberculosis*. The currently reported frequency of these species is likely to be an underestimation due to the lack of additional testing in cases of minimal disease or misidentification as *M. tuberculosis*. Despite the likely underestimation of NTM diseases, a growing number of NTM isolates are submitted to laboratories for identification. This may reflect an increase in the prevalence of opportunistic mycobacterial disease (notably in the AIDS context), or it may also reflect an increase in the number and nature of specimens submitted for culture brought about by a greater awareness of tuberculosis.

The ability to detect and identify these mycobacterial diseases in an early stage would potentially decrease morbidity and mortality and lessen its socio-economic impact. The 'gold standards' for definite diagnosis has remained culturing the mycobacterium combined with phenotypic tests (for example, the analysis of fatty acid and mycolic acid contents). However, traditional culture methods for human specimens can require up to 8 weeks (this varies according to the mycobacterial species). For instance, primary culture of *M. ulcerans* under optimal conditions may take several months (5).

Other methods based on molecular biology technologies have allowed the development of genetic tests for the identification of some mycobacterial species. In the last decade, the use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, oligotyping, and nucleic acid probes have been proposed as a mean for detecting and definitively identifying infectious agents (5). These tests are highly specific and rapid when compared to conventional culture method and have been applied to a wide variety of pathogens, especially to fastidious micro-organisms like mycobacteria. To date, the design of molecular tests has speeded up the diagnosis of this fastidious genus but still suffers some drawbacks. For species identification, a highly polymorphic region of the 16S rRNA gene has been shown to contain species-specific polymorphisms. This region is currently used in several commercially available assays, applicable either directly on a specimen (Accu-Probe; Gen-Probe) or after enzymatic amplification of the target for improved sensitivity (AMTD; Gen-Probe; Amplicor MTB, Roche). However, these commercial kits are mostly designed for the diagnosis of the most common disease-causing mycobacterial species, i.e. *M. tuberculosis* and MAC strains, and each kit has been designed to identify only one mycobacterial species per test which makes it a very expensive and limitative way of identifying mycobacterial species.

The newly identified and characterised sequences described in the present invention enable the design of differential diagnosis strategies. These diagnosis strategies are able to identify, in one single assay, a wide range of mycobacterial species that include TUB and NTM. In addition, within the NTM group, it is possible to differentiate between the members of the MAC-complex. Moreover, these molecular targets open new perspectives for the quantification of mycobacteria strains in clinical samples.

Aims of the invention

The present invention aims to provide new genetic sequences, methods and devices for the improvement of the identification and/or the quantification of various types of mycobacteria species through their upstream-p34 (us-p34) determinants, which allow by a rapid molecular screening, their epidemiological study as well as their rapid characterization in clinical human, animal and/or environmental samples.

Another aim of the invention is to identify similar genetic sequences which may exist in known and yet unknown Mycobacteria species.

Detailed description of the invention

The present invention relates more particularly to a method for detecting non-tuberculosis Mycobacterium strains (NTM) in a sample, comprising:

- (i) providing a non-tuberculosis Mycobacterium species-specific upstream p34 gene region (us-p34) nucleotide probe,
- (ii) reacting said us-p34 nucleotide probe with said sample under conditions that allow for the selective formation of nucleotide duplexes between said us-p34 nucleotide probe and a corresponding non-tuberculosis Mycobacterium nucleic acid target present in said sample, and,
- (iii) detecting any nucleotide duplexes containing said us-p34 nucleotide probe.

Said probes may comprise the whole or only parts of species-specific us-p34 gene region sequences as disclosed in Figure 3 which the skilled man have been aligned in Figure 8. On the basis of such an alignment (Figure 8) it is within the skilled man's knowledge to actually design suitable probes to be used in said method.

The present invention more particularly relates to a method as defined above, wherein said non-tuberculosis Mycobacterium species-specific us-p34 nucleotide probe specifically hybridizes with at least part of a sequence selected from Figure 3, or the complement thereof, or the corresponding sequences wherein T has been replaced by U.

The present invention more particularly relates to a method as defined above, wherein said non-tuberculosis *Mycobacterium* species-specific us-p34 nucleotide probe is selected from the group of sequences represented in Figure 3, or the complement thereof, or the corresponding sequences wherein T has been replaced by U.

The present invention further relates to a method for the differential detection of *Mycobacteria* in a sample, comprising:

- (i) providing at least two distinct non-tuberculosis *Mycobacterium* species-specific us-p34 nucleotide probes,
- (ii) reacting said us-p34 nucleotide probes with said sample under conditions that allow for the selective formation of nucleotide duplexes between said us-p34 specific nucleotide probe and a non-tuberculosis *Mycobacterium* nucleic acid present in said sample,
- (iii) detecting any nucleotide duplexes containing said us-p34 nucleotide probe, and,
- (iv) inferring from the nucleotide duplex formed, the presence and the identification of a specific non-tuberculosis *Mycobacterium* strain.

Said probes according to the present invention are preferably chosen from Table 3.

The present invention further relates to a method for detecting non-tuberculosis *Mycobacterium* strains in a sample, comprising:

- (i) providing at least two distinct non-tuberculosis *Mycobacterium* species-specific us-p34 primers,
- (ii) reacting said us-p34 primers with said sample under conditions that allow for the selective amplification of an us-p34 sequence in a non-tuberculosis *Mycobacterium* nucleic acid present in said sample, and,
- (iii) detecting the amplified product of step (ii).

NTM specific us-p34 primers are derived from us-p34 sequences (parts of the sequences as given in Figure 3) which are present in one specific species but not in the others. On the basis of the alignment of the sequences as given in Figure 3 (see Figure 8), it is within the knowledge of the skilled man to design actual primer sequences which will selectively amplify one species (type) of *Mycobacterium*.

The present invention further relates to a method for the differential detection of mycobacteria in a sample, comprising:

- (i) providing at least a sense and anti-sense us-p34 primer selected from Table 1 or 2 as shown in Figure 2,
- (ii) reacting said us-p34 primers with said sample under conditions that allow for the selective amplification of us-p34 sequences of a non-tuberculosis *Mycobacterium* nucleic acid present in said sample,

- (iii) detecting the amplified product of step (ii), and,
- (iv) inferring from the amplified product formed, the presence and the identification of a specific NTM.

Figure 2 shows the different amplification products which can be formed in step (ii).

The present invention further relates to a method for the detection of MAC complex Mycobacterium strains in a sample, comprising:

- (i) providing at least a sense and anti-sense us-p34 primer selected from Table 1 or 2 as shown in Figure 2;
- (ii) reacting said us-p34 primer with said sample under conditions that allow for the selective formation of nucleotide duplexes between said us-p34 nucleotide primer and a MAC complex Mycobacterium nucleic acid target in said sample;
- (iii) determining the us-p34 sequence of said MAC complex Mycobacterium nucleic acid in said sample.

With the expression "determining the us-p34 sequence" is meant, for instance, direct sequencing to confirm the presence of said specific MAC complex us-p34 sequence. Other methods can be by mass spectrometry, capillary electrophoresis or HPLC.

The present invention also relates to a method for the detection of a MOTT Mycobacterium strains in a sample, comprising:

- (i) providing at least a sense and anti-sense us-p34 primer selected from Table 1 or 2 as shown in Figure 2;
- (ii) reacting said us-p34 primer with said sample under conditions that allow for the selective formation of nucleotide duplexes between said us-p34 nucleotide primer and a MOTT Mycobacterium nucleic acid target in said sample;
- (iii) determining the us-p34 sequence of said MOTT Mycobacterium nucleic acid in said sample.

With the expression "determining the us-p34 sequence" is meant, for instance, direct sequencing to confirm the presence of said specific MOTT complex us-p34 sequence. Other methods can be by mass spectrometry, capillary electrophoresis or HPLC.

The present invention also relates to a method for detecting new us-p34 sequences in a sample, comprising:

- (i) providing at least a sense and anti-sense us-p34 primer selected from Table 1 or 2 as shown in Figure 2;
- (ii) reacting said us-p34 primers with said sample under conditions that allow for the amplification of an us-p34 sequence in a Mycobacterium nucleic acid target in said sample;

- (iii) determining the sequence of the amplification product obtained in (i).

The expression "new us-p34 sequences" refers to new (not yet identified) mycobacterium species sequences. Some of these new sequences are disclosed in Figure 3.

5

The present invention also relates to a method for the differential detection of mycobacteria in a sample, comprising:

- (i) providing at least a sense and anti-sense us-p34 primer selected from Table 1 or 2 as shown in Figure 2;
- 10 (ii) reacting said us-p34 primers with said sample under conditions that allow for the selective amplification of an us-p34 sequence in an non-tuberculosis Mycobacterium nucleic acid target in said sample;
- (iii) selectively hybridizing the amplification products obtained in (ii) with at least one non-tuberculosis Mycobacterium species-specific us-p34 nucleotide probe
- 15 (iv) detecting any nucleotide duplexes containing said us-p34 nucleotide probes,
- (v) inferring from the nucleotide duplex formed, the presence of a specific non-tuberculosis Mycobacterium strain.

Preferably said probes to be used in said method are disclosed in Table 3.

20

The present invention also relates to a non-tuberculosis Mycobacterium species-specific us-p34 nucleotide probe or primer comprising at least 8 contiguous nucleotides from one of the nucleic acid sequences represented in Figure 3, or the complement thereof, or the corresponding sequences wherein T has been replaced by U.

25

The present invention also relates to the non-tuberculosis Mycobacterium species-specific us-p34 nucleotide primer as defined above selected from Table 1 or 2.

The present invention also relates to the non-tuberculosis Mycobacteria species-specific us-p34 nucleotide probe as defined above selected from Table 3.

30

The present invention also relates to a nucleic acid comprising a sequence selected from Figure 3. Preferably said sequence is a continuous sequence of any of said SEQ ID Nos having a length from 8 to maximally the full length of said SEQ ID NO.

35

The present invention also relates to a composition comprising at least one nucleotide probe, primer or sequence as defined above. Said composition preferably contains two, three or more of said components.

40

The present invention also relates to a diagnostic kit comprising a probe, primer or sequence as defined above or a composition as defined above.

The present invention also relates to a solid support for the detection of mycobacteria comprising fixed to said support at least two capture probes selected from Table 3.

5 The present invention also relates to a solid support as defined above for use in a method as defined above.

Different techniques can be applied to perform the methods of the present invention. These techniques may comprise immobilizing the target polynucleic acids, after amplification, on a solid support and performing hybridization with labelled oligonucleotide probes. 10 Alternatively, the probes of the invention may be immobilized on a solid support (covalently or non-covalently) and hybridization may be performed with labelled target polynucleic acids, possibly after amplification. This technique is called reverse hybridization. Said techniques are well-known to the man skilled in the art.

15 It is to be understood that also any other technique for detection of the above-mentioned amplified target sequences are also covered by the present invention. Such a technique can involve sequencing or other micro-array methods known in the art.

The following definitions and explanations will permit a better understanding of the present invention.

20 The target material in the samples to be analysed may either be DNA or RNA, e.g. genomic DNA, messenger RNA or amplified versions thereof. These molecules are in this application also termed "polynucleic acids" or "nucleic acids".

Well-known extraction and purification procedures are available for the isolation of RNA or DNA from a sample (e.g. in Sambrook *et al.*, 1989).

25 The term "probe" according to the present invention refers to a single-stranded oligonucleotide which is designed to specifically hybridize to the target polynucleic acids. Preferably, the probes of the invention are about 5 to 50 nucleotides long, more preferably from about 10 to 25 nucleotides. Particularly preferred lengths of probes include 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 or 25 nucleotides. The nucleotides as used in 30 the present invention may be ribonucleotides, deoxyribonucleotides and modified nucleotides such as inosine or nucleotides containing modified groups which do not essentially alter their hybridization characteristics.

35 The term "primer" according to the present invention refers to a single stranded oligonucleotide sequence capable of acting as a point of initiation for synthesis of a primer extension product which is complementary to the nucleic acid strand to be copied. The length and the sequence of the primer must be such that they allow to prime the synthesis of the extension products. Preferably the primer is about 5-50 nucleotides long. Specific length and sequence will depend on the complexity of the required DNA or RNA targets, as well as on

the conditions at which the primer is used, such as temperature and ionic strength. It is to be understood that the primers of the present invention may be used as probes and vice versa, provided that the experimental conditions are adapted.

The expression "suitable primer pair" in this invention refers to a pair of primers
5 allowing specific amplification of a specific us-p34 target polynucleic acid fragment as defined above.

The term "target region" of a probe or a primer according to the present invention is a sequence within the polynucleic acids to be detected to which the probe or the primer is completely complementary or partially complementary (i.e. with some degree of mismatch).
10 It is to be understood that the complement of said target sequence is also a suitable target sequence in some cases.

"Specific hybridization" of a probe to a target region of a polynucleic acid means that said probe forms a duplex with part of this region or with the entire region under the experimental conditions used, and that under those conditions said probe does not form a
15 duplex with other regions of the polynucleic acids present in the sample to be analysed.

"Specific hybridization" of a primer to a target region of a polynucleic acid means that, during the amplification step, said primer forms a duplex with part of this region or with the entire region under the experimental conditions used, and that under those conditions said primer does not form a duplex with other regions of the polynucleic acids present in the
20 sample to be analysed. It is to be understood that "duplex" as used hereby, means a duplex that will lead to specific amplification.

The fact that amplification primers do not have to match exactly with the corresponding target sequence in the template to warrant proper amplification is amply documented in the literature. However, when the primers are not completely complementary to their target
25 sequence, it should be taken into account that the amplified fragments will have the sequence of the primers and not of the target sequence. Primers may be labelled with a label of choice (e.g. biotin). The amplification method used can be either polymerase chain reaction (PCR), ligase chain reaction (LCR), nucleic acid sequence-based amplification (NASBA), transcription-based amplification system (TAS), strand displacement amplification (SDA) or amplification by means of Q β replicase or any other suitable method to amplify
30 nucleic acid molecules known in the art.

Probes and primer sequences are represented throughout the specification as single stranded DNA oligonucleotides from the 5' to the 3' end. It is obvious to the man skilled in the art that any of the below-specified probes can be used as such, or in their complementary
35 form, or in their RNA form (wherein T is replaced by U).

The probes, primer and other nucleotide sequences according to the invention can be prepared by cloning of recombinant plasmids containing inserts including the corresponding

nucleotide sequences, if need be by excision of the latter from the cloned plasmids by use of the adequate nucleases and recovering them, e.g. by fractionation according to molecular weight. The probes according to the present invention can also be synthesized chemically, for instance by the conventional phospho-ester method.

5 The oligonucleotides used as primers or probes may also comprise nucleotide analogues such as phosphorothiates, alkylphosphorothiates or peptide nucleic acids or may contain intercalating agents. As most other variations or modifications introduced into the original DNA sequences of the invention these variations will necessitate adaptations with respect to the conditions under which the oligonucleotide should be used to obtain the
10 required specificity and sensitivity. However the eventual results of hybridization will be essentially the same as those obtained with the unmodified oligonucleotides. The introduction of these modifications may be advantageous in order to positively influence characteristics such as hybridization kinetics, reversibility of the hybrid-formation, biological stability of the oligonucleotide molecules, etc.

15 The term "solid support" can refer to any substrate to which an oligonucleotide probe can be coupled, provided that it retains its hybridization characteristics and provided that the background level of hybridization remains low. Usually the solid substrate will be a microtiter plate, a membrane (e.g. nylon or nitrocellulose) or a microsphere (bead) or a chip (biochip). Prior to application to the membrane or fixation it may be convenient to modify the nucleic
20 acid probe in order to facilitate fixation or improve the hybridization efficiency. Such modifications may encompass homopolymer tailing, coupling with different reactive groups such as aliphatic groups, NH_2 groups, SH groups, carboxylic groups, or coupling with biotin, haptens or proteins.

The term "labelled" refers to the use of labelled nucleic acids. Labelling may be carried
25 out by the use of labelled nucleotides incorporated during the polymerase step of the amplification or labelled primers, or by any other method known to the person skilled in the art. The nature of the label may be isotopic (^{32}P , ^{35}S , etc.) or non-isotopic (biotin, digoxigenin, etc.).

The term "biological sample or sample" refers to for instance naso-pharyngeal aspirates, throat or nasopharyngeal swabs, nasopharyngeal washes or tracheal aspirates or
30 other respiratory tract sample comprising DNA or RNA.

For designing probes with desired characteristics, the following useful guidelines known to the person skilled in the art can be applied.

35 Because the extent and specificity of hybridization reactions such as those described herein are affected by a number of factors, manipulation of one or more of those factors will determine the exact sensitivity and specificity of a particular probe, whether perfectly

complementary to its target or not. The importance and effect of various assay conditions are explained further herein.

The stability of the [probe : target] nucleic acid hybrid should be chosen to be compatible with the assay conditions. This may be accomplished by avoiding long AT-rich sequences, by terminating the hybrids with G:C base pairs, and by designing the probe with an appropriate T_m . The beginning and end points of the probe should be chosen so that the length and %GC result in a T_m about 2-10°C higher than the temperature at which the final assay will be performed. The base composition of the probe is significant because G-C base pairs exhibit greater thermal stability as compared to A-T base pairs due to additional hydrogen bonding. Thus, hybridization involving complementary nucleic acids of higher G-C content will be more stable at higher temperatures.

Conditions such as ionic strength and incubation temperature under which a probe will be used should also be taken into account when designing a probe. It is known that the degree of hybridization will increase as the ionic strength of the reaction mixture increases, and that the thermal stability of the hybrids will increase with increasing ionic strength. On the other hand, chemical reagents, such as formamide, urea, DMSO and alcohols, which disrupt hydrogen bonds, will increase the stringency of hybridization. Destabilization of the hydrogen bonds by such reagents can greatly reduce the T_m . In general, optimal hybridization for synthetic oligonucleotide probes of about 10-60 bases in length occurs approximately 5°C below the melting temperature for a given duplex. Incubation at temperatures below the optimum may allow mismatched base sequences to hybridize and can therefore result in reduced specificity.

It is desirable to have probes which hybridize only under conditions of high stringency. Under high stringency conditions only highly complementary nucleic acid hybrids will form; hybrids without a sufficient degree of complementarity will not form. Accordingly, the stringency of the assay conditions determines the amount of complementarity needed between two nucleic acid strands forming a hybrid. The degree of stringency is chosen such as to maximize the difference in stability between the hybrid formed with the target and the non-target nucleic acid.

Regions in the target DNA or RNA which are known to form strong internal structures inhibitory to hybridization are less preferred. Likewise, probes with extensive self-complementarity should be avoided. As explained above, hybridization is the association of two single strands of complementary nucleic acids to form a hydrogen bonded double strand. It is implicit that if one of the two strands is wholly or partially involved in a hybrid that it will be less able to participate in formation of a new hybrid. There can be intramolecular and intermolecular hybrids formed within the molecules of one type of probe if there is sufficient self complementarity. Such structures can be avoided through careful probe design. By

designing a probe so that a substantial portion of the sequence of interest is single stranded, the rate and extent of hybridization may be greatly increased. Computer programs are available to search for this type of interaction. However, in certain instances, it may not be possible to avoid this type of interaction.

5 Standard hybridization and wash conditions are disclosed in the Materials & Methods section of the Examples. Other conditions are for instance 3X SSC (Sodium Saline Citrate), 20% deionized FA (Formamide) at 50°C. Other solutions (SSPE (Sodium saline phosphate EDTA), TMAC (Tetramethyl ammonium Chloride), etc.) and temperatures can also be used provided that the specificity and sensitivity of the probes is maintained. When needed, slight
10 modifications of the probes in length or in sequence have to be carried out to maintain the specificity and sensitivity required under the given circumstances.

 The term "hybridization buffer" means a buffer allowing a hybridization reaction between the probes and the polynucleic acids present in the sample, or the amplified products, under the appropriate stringency conditions.

15 The term "wash solution" means a solution enabling washing of the hybrids formed under the appropriate stringency conditions.

 The invention, now being generally described, will be more readily understood by reference to the following examples and figures, which are included merely for the purposes of illustration of certain aspects and embodiments of the present invention and are in no way
20 to be construed as limiting the present invention. All of the references mentioned herein are incorporated by reference.

FIGURE LEGENDS**Figure 1.**

Multiple nucleotide sequences alignment of *M. bovis* (MB), *M. tuberculosis* (MT), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MPT) and *M. avium* ss (MA) *us-p34* genes. Gaps between sequences are indicated by dots (.). Vertical bar (|) indicates identity across sequences. The start codon (ATG) for the *p34* ORF is in bold. Primer sequences are indicated by shaded boxes. The arrows indicate point mutations between *M. tuberculosis* and *M. bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* ss.

Figure 2.

Amplifications of *us-p34* regions with primers U1, U2, U3, U4 and U9.

Figure 3.

New *us-p34* sequences (5' to 3'). Primers used to obtain the sequence (either U2-U1 ; U3-U1 ; U4-U1 ; U2-U9 ; U3-U9 or U4-U9) and the amplicon size are as indicated. Additional internal primers (U1, U2, U3) have been shown within the sequences. Sequence variations (point mutations) found in the same species (for instance *M. ulcerans*) are also indicated when known.

Figure 4.

U1-U4 consensus amplification of *us-p34* regions of different mycobacterial species.

Figure 5.

Specific and non-specific hybridization.

Figure 6.

Differential reverse hybridization of mycobacteria target amplicons on a nylon membrane disclosing species-specific mycobacteria probes.

- a) Unlabeled amplified DNA segments specific for various mycobacteria species were first transferred on nylon membrane (*M. tuberculosis* (TB), *M. avium* (AV), *M. szulgai* (SZ), *M. kansasii* (KA), *M. xenopi* (XE), *M. simiae* (SI) and *M. mageritense* (ML)).
- b) Digoxigenin-labeled amplicons from *M. tuberculosis* (TB*), *M. avium* (AV*), *M. szulgai* (SZ*), *M. kansasii* (KA*), *M. xenopi* (XE*) and *M. simiae* (SI*) were hybridized on the nylon membrane. Specific differential hybridization is obtained.

Figure 7.

Example of biochips detecting specifically *M. goodii*

Figure 8.

Alignment of several Mycobacterial *us-p34* sequences.

EXAMPLES**Preparation of mycobacterial DNA**

5

a) short protocol (mycobacteria obtained from the Pasteur Institute) :

DNA has been obtained by boiling the samples in order to put the mycobacterial DNA into solution.

b) long protocol (mycobacteria obtained from the Institute of Tropical Medicine):

- 10 Mycobacteria (10 mg [wet weight]) were suspended in 200 μ l of lysis solution (0.1 M NaOH, 1 M NaCl, and 5% sodium dodecyl sulfate [SDS]) and heated (100°C) for 20 min. The suspension was then cooled, neutralized with 3 volumes of 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) buffer, and centrifuged (5,000 \times g, 5 min). Supernatants were extracted with phenol-chloroform, and DNA was precipitated with ethanol, collected by centrifugation, dissolved in 50 μ l of H₂O, and
- 15 stored at 20°C.

PCR amplifications

- For amplification, an aliquot (10 μ l) of the DNA samples was added to 90 μ l of PCR mixture consisting of 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 0.25 mM (each) deoxynucleoside triphosphates, 10 pmol of each primer (Tables 1 and 2) and 0.625 U of DyNAzyme DNA polymerase (Finnzymes Inc., Espoo, Finland). After an initial denaturation step (3 min at 98°C), 30 cycles of amplification were performed as follows:
- 25 denaturation at 98°C for 30 s, annealing at 58°C for 45 s, and DNA extension at 72°C for 30 s, with an increment of 1 s per cycle for the denaturation and extension segments. A final extension was performed at 72°C for 15 min. Amplifications were carried out in a DNA 2400 thermocycler (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, Calif.). PCR products were checked by loading 5 μ l on a 2% (w/vol) agarose gel. Electrophoresis is performed in 0.1 M Tris HCl (pH 8.8), 80 mM boric acid, 1 mM EDTA buffer containing 0.5 μ g of ethidium bromide per ml. DNA fragments are visualized on a UV transilluminator at 300 nm. PCR
- 30 products were cloned using the TOPO XL PCR cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, Calif.), according to the manufacturer's protocol. The clones were further sequenced with the Taq Dye Deoxy Terminator Cycle sequencing kit and an ABI 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

35

DNA sequence analysis.

Nucleotide sequence analyses were performed with the Genetics Computer Group software obtained from the University of Wisconsin, through the use of the Belgian EMBnet Node facility. Sequences were aligned by the Pileup program and paired comparisons were realised with the Bestfit program.

Reverse hybridization analysis.

Mycobacterial species-specific capture probes were produced by amplification of the *us*-P34 cloned-DNA from the reference strains with primers U1 and U4. Amplified DNA fragments were sequentially transferred onto nylon membranes (Hybond-N+; Amersham, Little Chalfont, United Kingdom) according to the Southern blot method. After 2 h of prehybridization, membranes were hybridized with *us*-p34 digoxigenin-labeled target probes, obtained by PCR amplification of reference or clinical mycobacterial genomic DNA with primers U1 and U4 (Table 1), in the presence of DIG-11-dUTP. Hybridization of heat denatured target probes (5 min at 95 °C) was performed at 50 °C for 4 h in 2x SSC (1x SSC is 0.15M NaCl and 0.015 M sodium citrate), 1% blocking reagent, 0.1% SDS, 0.1% N-Lauroylsarcosine, 5 mg/ml of salmon sperm DNA and 5% formamide. Filters were then washed twice with 2x SSC (1x SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate)-0.1% SDS at 37°C for 5 min, and twice with 0.2x SSC-0.1% SDS at 50°C for 5 min. Hybridized digoxigenin-labeled DNA fragments were detected through alkaline-phosphatase-labeled anti-DIG Fab fragments. Colorimetric detection was performed with Nitro Blue Tetrazolium Chloride and 5,3-bromo-4-indolylphosphate (BCIP) (Boehringer Mannheim) according to the manufacturer's instructions.

Analysis on "Mycobacteria Blochins".

Design of the blochins. Mycobacterium micro-arrays have been developed by AAT (Namur, Belgium). This array is a glass slide bearing on its surface different mycobacterial species-specific capture nucleotide sequences (Table 3). Fixation, positive and negative hybridization controls capture probes are also included in the array and each capture probe of the array is composed of four replicates.

Production of biotinylated amplicons. Amplification of the mycobacterial *us*-p34 sequences is performed in a final volume of 50 µl containing 2.5 mM MgCl₂, 75 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.5 µM of primers U4 and U5, 200 µM of dATP, 200 µM of

dCTP, 200 μ M of dGTP, 150 μ M of dTTP, 50 μ M of biotin-16-dUTP, 0.5 U of uracil-DNA-Glycosylase (Boehringer Mannheim, Germany), 1.25 U of Taq DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) and 10 μ l of DNA template. The reagents are first incubated at 94°C for 5 min and then cycled 40 times in a DNA 9600 thermocycler (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) using the following temperatures and cycle times: 94°C for 30 s, 49°C for 45 s, 72°C for 30 s. A final extension step of 10 min at 72°C is performed. PCR products are directly used or stored at -20°C.

Hybridization and colorimetric detection. The procedure for detecting the PCR products is carried out according to the manufacturer's instructions (AAT, Namur, Belgium) as follows: 5 μ l of PCR product and 5 μ l of the positive control, provided in the kit, are denatured with fresh NaOH 0.05N for 5 min at room temperature. This solution is then mixed with 35 μ l of hybridization solution and loaded on the array framed by a hybridization chamber (Biozym, Landgraaf, The Netherlands). The chamber is closed with a plastic coverslip and hybridization is carried out for 30 min at 53°C. Slides are washed four times 1 min with washing buffer. The glass samples are then incubated 45 min at room temperature with 800 μ l of streptavidin-conjugate 1000 times diluted in blocking buffer. After 5 washes, the slides are incubated 3 times 10 min with 800 μ l of revelation mixture, then rinsed with water, dried and imaged using a colorimetric microarray reader (AAT, Namur, Belgium). While a quick visual inspection already yields most of the images relevant informations, the image obtained is analysed by an algorithm allowing the quantification of the spots intensities values and by a pattern recognition algorithm.

25 Cloning and sequencing of the upstream-P34 region of mycobacterial species.

Comparison of homologous p34 genes and its regulatory sequences (upstream p34 or us-p34) from *M. tuberculosis* (GenBank accession no. Z79700) and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (GenBank accession no. X88102) showed the presence of deletions in the *M. tuberculosis* region upstream of the p34 protein start codon (Figures 1 and 2). To confirm and extend these findings, the us-p34 sequence of *M. bovis* BCG and *M. avium* D4 were amplified and sequenced. Multiple sequences alignment of this region revealed interspecies polymorphisms specific for both tuberculous (*M. tuberculosis* and *M. bovis* Bacille de Calmette et Guérin [BCG]) and non-tuberculous (*M. avium* sp and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*) mycobacteria, i.e. the us-p34 fragment was 79 bases shorter in the tuberculous species. Conversely, us-p34 appeared to be highly conserved within each group: differentiation between *M. tuberculosis* and *M. bovis* relied on a single T to C

transition at position 41 of us-p34, and a single C to G transversion at position 284 of us-p34 in *M. avium* ss and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Figure 1).

Based on sequence homology between the *M. tuberculosis* / *M. bovis* and *M. avium* / *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, several oligonucleotides, U1, U2, U3, U4 and U9 (Tables 1 and 2), matching conserved sequences of the polymorphic us-p34 region, were designed to amplify the corresponding region of others reference bacteria from the mycobacterial genus, *M. szulgai*, *M. africanum*, *M. goodii*, *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. malmoense* and *M. simiae* (Table 3). These fragments have been cloned and sequenced (Figure 3).

Development of a consensus PCR amplification of mycobacterial species.

Based on the mycobacterial sequences of us-p34, a consensus PCR assay was developed. Primers U1 and U4 have allowed to amplify the corresponding fragments, ranging from 163 bp and 298 bp in size, for *M. szulgai* (163 bp), *M. non chromogenicum* (169 bp), *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* (178 pb), *M. goodii* (182 bp), *M. gastri* (223 bp), *M. kansasii* (225 bp), *M. marinum*, and *M. ulcerans* (236 pb), *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. paratuberculosis* (258 bp), *M. scrofulaceum* (259 bp), *M. xenopi* (265 bp), *M. lepre* (269 bp), *M. malmoense* (290 bp) and *M. simiae* (296 bp) (Figure 4; Table 4). Sequences alignments indicate both size and nucleotide sequence polymorphisms, as illustrated by some pair-wised alignments of all mycobacterial sequences with *M. tuberculosis* us-p34 region.

Validation of the consensus mycU1-mycU4 PCR on clinical isolates.

The reliability of this consensus amplification strategy was tested on a range of clinical mycobacterial isolates (Table 4). The strategy is characterized by a good sensitivity for most mycobacteria. The lower sensitivity displayed for some species is probably related rather to the DNA sample than to a lack of sensitivity of the strategy. As a matter of fact, *M. marinum*-*M. ulcerans* amplifications show a better sensitivity for "long protocol" DNA preparations (20/20) than for the "short protocol" ones (4/10). The quality of these "short protocol" DNA preparations have to be checked before running further conclusions. This could indeed influence further identification of potentially specific amplicons in other mycobacterial species (such as, for example, *M. phlei*, *M. flavescentis*, *M. nonchromogenicum*, *M. chelonae*)

Development of species-specific PCR amplifications.

Based on alignment of all upstream p34 sequences between U1 and U4 (which contain most inter-species differences) or at the broadest between U9 and U2 (which also may contain specific inter-strain differences), primers which will selectively amplify one strain (two new primers or a combination of one new primer and one primer presented in Tables 1 and 2) are designed. This strategy enables the differentiation of the mycobacterial species by PCR.

Reverse hybridization strategy.

Based on homologous and non-homologous hybridization of amplicons from the same species and amplicons from two different species, respectively (Figure 5), a reverse hybridization assay was set up. In a first step, species-specific probes corresponding to each mycobacteria species, were produced by amplification of reference strains us-p34 cloned DNA with the two consensus primers U1 and U4 and were immobilized on nylon strips. DNA of species to be identified were amplified in the presence of the same primers, biotinylated at their 5' ends, hybridized with the immobilized probes and colorimetrically assayed. An assay, allowing a correct discrimination between *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. simiae* and *M. mageritense* is presented in Figure 6.

Development of a "Mycobacteria Biochips".

The polymorphic us-p34 sequences can also be applied on low-density microarray technology in order to develop simultaneous species-specific detection of mycobacteria. In a preliminary study, mycobacteria microarrays, bearing different mycobacterial species-specific capture probes, have been developed by AAT (Namur, Belgium). These probes were hybridized with the us-p34 biotinylated amplicons from the different mycobacterial species. Illustration of a specific detection of *M. goodii* versus *M. tuberculosis*, *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. intracellulare*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. xenopi*, *M. mageritense*, *M. szulgai* and *M. scrofulaceum* specific capture probes is presented in Figure 7.

References

- Portaels F. Epidemiology of mycobacterial diseases. Clinica in Dermatology 1995 ;13 :207-222.
- Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis : morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA 1995 ;273 :220-28.
- Cobelens FG, van Deuren H, Draayer-Jansen WJ, et al. Risk of infection with Mycobacterium tuberculosis in travelers to areas of high tuberculosis endemicity. Lancet 2000 ;356 :481-485.
- Pablos-Mendez A, Raviglione MC, Laszlo A, et al ; Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. New Engl J Med 1998;338 :1841-49.
- Tsang AY and Farber ER. The primary isolation of Mycobacterium ulcerans. Am. J. Clin. Pathol. 1973 ; 59 : 688-692.
- Portaels F, Fonteyne PA, De Boenhout H, de Rijk P, Guédénon A, Hayman J, Meyers WM. Variability in 3' end of 16S rRNA sequence of Mycobacterium ulcerans is related to geographic origin of isolates. J. Clin Microbiology 1996 ;34 :982-985.

Table 1. Oligonucleotides

These consensus primers have been successfully used to amplify a wide panel of reference and clinical mycobacterial strains (see Table 4)

U1: 5'-GAGTAGGTCATGGCTCCTCC-3' (antisense)
U4: 5'-CATGCAGCGAATTAGAACGT-3' (sense)

Table 2. Oligonucleotides

U2: 5'-AACTTGACGAACTCGCCG-3' (sense)
U3: 5'-AGGTATTCGCCAGCATG-3' (sense)
U5: 5'-GTASGTCATRRSTYCTCC-3' (antisense)
U8: 5'-GGTGAACATTGGGCCGAA-3' (antisense)

U5 is an example of a degenerated primer that in combination with U4, as a consensus or universal primer, was used to amplify DNA fragments of various mycobacterial species. These mycobacterial species could subsequently be identified by reverse hybridization on a biochips

Table 3. Examples of capture probes that can specifically hybridize Mycobacteria strains on a biochips.

Avium :	CGGTCGTCTCCGAAGCCCGCG
Gastrii 1 :	GATCGGCAGCGGTGCCGGG
Gastrii 2 :	GTATCGCGGGCGGCAAGGT
Gastrii 3 :	TCTGCCGATCGGCAGCGGTGCCGG
Gastrii 4 :	GCCGGGGCCGGTATTCGCGGGCGG
Gordonae :	GACGGGCACTAGTTGTCAGAGG
Intracellulare 1 :	GGGCCGCCGGGGCCTCGCCG
Intracellulare 2 :	GCCTCGCCGCCCAAGACAGTG
Leprae:	GATTCGGCGTCCATCGGTGGT
Kansasii 1 :	GATCGTCGGCAGTGGTGACGG
Kansasii 2 :	TCGTCGGCAGTGGTGAC
Kansasii 3 :	ATCCGCCGATCGTCGGCAGTGGTGACG
Malmoeense :	GACCCACAACACTGGTCGGCG
Marinum :	CGGAGGTGATGCCGCTGGTCC
Scrofulaceum :	CGGCGGCACGGATCGGCGTC
Simiae :	ATCGCTCCTGGTCGCGCCTA
Szulgai :	CCCGGCGCGACCAGCAGAACG
Tuberculosis:	GCGGTCCAGTCGTTAATGTCCG
Xenopi:	CGGTAGAAGCTGCGATGACACG

Table 4. Validation of the consensus U1-U4 amplification on clinical mycobacterial strains.

	Mycobacteria	size (bp)	Nbr of + amplif. /Nbr of samples
5	<u>Tuberculous Group</u>		
	<i>M. tuberculosis</i>	177	15/15
	<i>M. bovis</i>	177	9/10
	<i>M. africanum</i>	177	5/5
10	<u><i>M. avium</i> Complex</u>		
	<i>M. avium</i>	256	18/17
	<i>M. paratuberculosis</i>	256	21/21
	<i>M. intracellulare</i>	256	9/9
	<i>M. scrofulaceum</i>	259	4/5
15	<u>MOTT (Myc. Other Than Tub)</u>		
	<i>M. szulgai</i>	163	9/9
	<i>M. kansasii</i>	225	10/11
	<i>M. gastri</i>	223	2/2
	<i>M. xenopi</i>	285	12/12
20	<i>M. ulcerans</i>	211	20/20
	<i>M. leprae</i>		1/1
	<i>M. non chromogenicum</i>		1/2
	<i>M. smitoe</i>	298	6/11
	<i>M. mageritense</i>	290	4/7
25	<i>M. goodii</i>	182	4/10
	<i>M. marinum</i>	236	1/4

CLAIMS

1. Method for detecting non-tuberculosis *Mycobacterium* strains (NTM) in a sample, comprising:
 - 5 (i) providing a non-tuberculosis *Mycobacterium* species-specific upstream p34 gene region (us-p34) nucleotide probe,
 - (ii) reacting said us-p34 nucleotide probe with said sample under conditions that allow for the selective formation of nucleotide duplexes between said us-p34 nucleotide probe and a corresponding non-tuberculosis *Mycobacterium* nucleic acid target present in
 - 10 said sample, and,
 - (iii) detecting any nucleotide duplexes containing said us-p34 nucleotide probe.
2. Method according to claim 1, wherein said non-tuberculosis *Mycobacterium* species-specific us-p34 nucleotide probe specifically hybridizes with at least part of a sequence
 - 15 selected from Figure 3, or the complement thereof, or the corresponding sequences wherein T has been replaced by U.
3. Method according to claim 1 or 2, wherein said non-tuberculosis *Mycobacterium* species-specific us-p34 nucleotide probe is selected from the group of sequences represented in
 - 20 Figure 3, or the complement thereof, or the corresponding sequences wherein T has been replaced by U.
4. Method for the differential detection of *Mycobacteria* in a sample, comprising:
 - 25 (i) providing at least two distinct non-tuberculosis *Mycobacterium* species-specific us-p34 nucleotide probes,
 - (ii) reacting said us-p34 nucleotide probes with said sample under conditions that allow for the selective formation of nucleotide duplexes between said us-p34 specific nucleotide probe and a non-tuberculosis *Mycobacterium* nucleic acid present in said sample,
 - 30 (iii) detecting any nucleotide duplexes containing said us-p34 nucleotide probe, and,
 - (v) inferring from the nucleotide duplex formed, the presence and the identification of a specific non-tuberculosis *Mycobacterium* strain.
5. Method for detecting non-tuberculosis *Mycobacterium* strains in a sample, comprising:
 - 35 (i) providing at least two distinct non-tuberculosis *Mycobacterium* species-specific us-p34 primers,
 - (ii) reacting said us-p34 primers with said sample under conditions that allow for the selective amplification of an us-p34 sequence in a non-tuberculosis *Mycobacterium* nucleic acid present in said sample, and,
 - 40 (iv) detecting the amplified product of step (ii).

6. Method for the differential detection of mycobacteria in a sample, comprising:

- (i) providing at least a sense and anti-sense us-p34 primer selected from Table 1 or 2 as shown in Figure 2;
- (ii) reacting said us-p34 primers with said sample under conditions that allow for the selective amplification of us-p34 sequences of a non-tuberculous Mycobacterium nucleic acid present in said sample;
- (iii) detecting the amplified product of step (ii); and
- (iv) inferring from the amplified product formed, the presence and the identification of a specific NTM.

7. Method for the detection of MAC complex Mycobacterium strains in a sample, comprising:

- (i) providing at least a sense and anti-sense us-p34 primer selected from Table 1 or 2 as shown in Figure 2;
- (ii) reacting said us-p34 primer with said sample under conditions that allow for the selective formation of nucleotide duplexes between said us-p34 nucleotide primer and a MAC complex Mycobacterium nucleic acid target in said sample;
- (iv) determining the us-p34 sequence of said MAC complex Mycobacterium nucleic acid in said sample.

8. Method for the detection of a MOTT Mycobacterium strains in a sample, comprising:

- (i) providing at least a sense and anti-sense us-p34 primer selected from Table 1 or 2 as shown in Figure 2;
- (ii) reacting said us-p34 primer with said sample under conditions that allow for the selective formation of nucleotide duplexes between said us-p34 nucleotide primer and a MOTT Mycobacterium nucleic acid target in said sample;
- (iv) determining the us-p34 sequence of said MOTT Mycobacterium nucleic acid in said sample.

9. Method for detecting new us-p34 sequences in a sample, comprising:

- (i) providing at least a sense and anti-sense us-p34 primer selected from Table 1 or 2 as shown in Figure 2;
- (iv) reacting said us-p34 primers with said sample under conditions that allow for the amplification of an us-p34 sequence in a Mycobacterium nucleic acid target in said sample;
- (v) determining the sequence of the amplification product obtained in (ii).

10. Method for the differential detection of mycobacteria in a sample, comprising:
- (vi) providing at least a sense and anti-sense us-p34 primer selected from Table 1 or 2 as shown in Figure 2;
 - (vii) reacting said us-p34 primers with said sample under conditions that allow for the selective amplification of an us-p34 sequence in a non-tuberculosis *Mycobacterium* nucleic acid target in said sample;
 - (viii) selectively hybridizing the amplification products obtained in (vi) with at least one non-tuberculosis *Mycobacterium* species-specific us-p34 nucleotide probe selected from the group of sequences represented in Figure 3,
 - (ix) detecting any nucleotide duplexes containing said us-p34 nucleotide probes,
 - (x) inferring from the nucleotide duplex formed, the presence of a specific non-tuberculosis *Mycobacterium* strain.
11. A non-tuberculosis *Mycobacterium* species-specific us-p34 nucleotide probe or primer comprising at least 8 contiguous nucleotides from one of the nucleic acid sequences represented in Figure 3, or the complement thereof, or the corresponding sequences wherein T has been replaced by U.
12. The non-tuberculosis *Mycobacterium* species-specific us-p34 nucleotide primer of claim 11 selected from Table 1 or 2.
13. The non-tuberculosis *Mycobacteria* species-specific us-p34 nucleotide probe of claim 11 selected from Table 3.
14. A nucleic acid comprising a sequence selected from Figure 3.
15. A composition comprising at least one nucleotide probe, primer or sequence according to any of claims 11 to 14.
16. A diagnostic kit comprising a probe, primer or sequence according to any of claims 11 to 14 or a composition according to claim 15.
17. A solid support for the detection of mycobacteria comprising fixed to said support at least two capture probes selected from Table 3.
18. A solid support according to claim 16 for use in a method of any of claims 1 to 4 or 10.

Figure 1.

Multiple nucleotide sequence alignment of *M. bovis* (MB), *M. tuberculosis* (MT), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MPT) and *M. avium* ss (MA) us-p34 genes. Gaps between sequences are indicated by dots (.). Vertical bar (|) indicates identity across sequences. The start codon (ATG) for the p34 ORF is in bold. Primer sequences are indicated by shaded boxes. The arrows indicate point mutations between *M. tuberculosis* and *M. bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* ss.

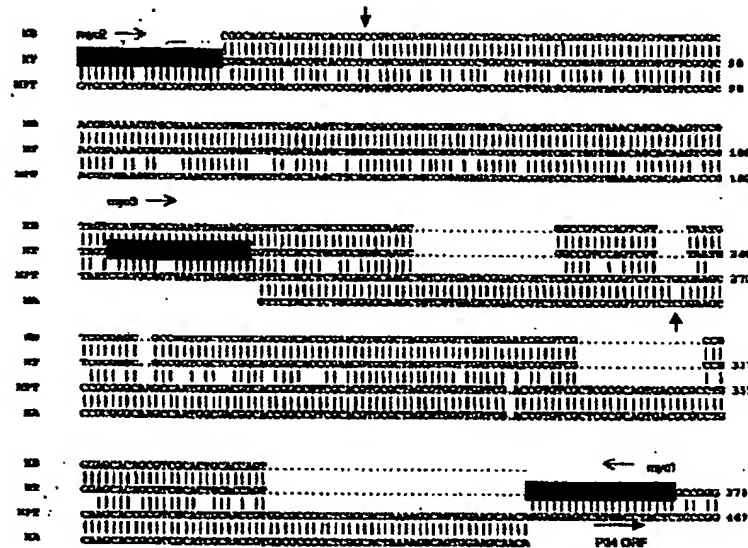


Figure 2. Amplifications of us-p34 regions with primers U1, U2, U3, U4 and U9.

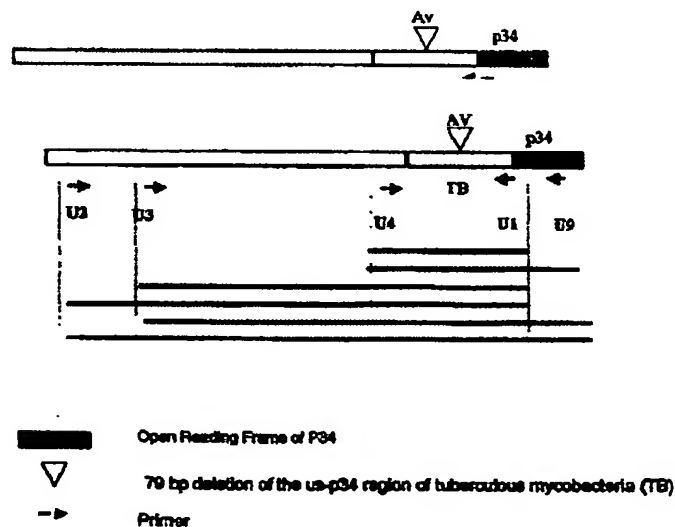


Figure 3. New us-p34 sequences

M. gastris Length: 542

```

1  GTGGCCGGG GCGCGGGG CAGCCATGG TGGGAGTT CTTGCGGG
51  GCGGACGGC AFGCTGGGG ATTCCTGCG TGTTCAGCC GATTCGACG
101  CCGACCTGA CCGCGGGG GGAATGTGT CAGCGTGGC AATGCTTTG
151  GCGAGCTGA TCGGTCTAG CTCCACGGA GCGACGGC GGTGACAGC
201  CTGACTGGG AGGTGACGC TGAACCTCA CCGACCTCA CCACGGGTC
251  CAGGCTGGC ATATAGCGT CTTCCGCGC CAGCGCTCA CCGTGGTGG
301  GATGGCGGC TTCCGCTTG ACCGGAATG GCGTGTTC GCGACCTAG
351  AGAGTCGAA AGCCTGGTC GTCGGCGAG TTGCGGCTG CCGCGGGA
401  GATCCGAGG TCGTGTGA AAAGGACAG CCGTAATCC ATGACGAA
451  TTGAGCGTG TTCTACTCC GCGCGCGAG CGCTCATCT GCGATCGGC
501  AGCGGTGGG GCGCGGAT CCGCGGCGC AAGGTGCGA CCGGTGAGT
551  ACCCGCGGT GCGCTGCGT GGTCTATGA ATTGTGTGC AGGAGGAA
601  CTTGCAATG CAGAGCGGT AGCAGCGCA CCGAGGTAA CA

```

M. gardense Length: 745

```

1  GTGGACGAC GCGCGCGAG CAGCTTATG TGGCGAGCT CTTGCGGTT
51  CCGAGCGAG CCGAGCGGA GGTAACTCG CCGCGGAG AGGTGATCA
101  CCGTGGGAT GCTTTTGGC AAGGTATCG GGTATGCTC GACCGGAC
151  GCGAGTGGG TCGGAGGCG CAGCGCGAG GTGCGGCGC AGCGCGGCG
201  CAGGCTGAC CAGGATCCA GGTGCGCAT ATAGCGTGG TCGGCGAGG
251  TCTGCTTCC GGTGCTGGA TGAAGCGCT CCGTTTAT CCGCATATC
301  GGTGTTCGG GTACCTAGG GGTCTGAAA CCAATGTGT CCGCAAGTT
351  CCGTCTTCC GCGGGGAAA TACCGGATC GCTGGTGA CAGAGCGGC
401  TGTATCTAT GCGGATTT AGAAGTGT CTAATTTTG CCGAGCGGA
451  CCGCTGGG CCGCGGCGC TAGTTGTAG AGGTGCGTA GGTGCTTA
501  TCGATGCGT GCGAGCGGT ACCGCTGCT GCGAGCGAG ACCGCGGTC
551  ACCCGCGCG AGCAACAGG AGGCTATG ACTTACCGC CCGTATGTC
601  CCGATATCA TCGCGGAGC AGTGGGCGC CAGTACGAC AGTCTGCTC
651  CCGCGCGCG CCAATCGAG CCGGTGAAA GCAAGCTGG ACTGTGCTG
701  GCGTGGCGG TGGGCGGCT GCGCTACTG GGTACTCTT TCGC

```

M. intracellulare Length: 216

1 GTTCTACTG TACTAGCAA GTCCGGTGA TACGACCTT CTCCCGAG
 51 GGCCTCCGG GGCCTCCGG CCAGGACG TGGCGGCG ACCGTTCC
 101 GCACCTCCG TAGCTGGG GATCAGCCT GTCCGATCC GGTGCGGC
 151 CTGCAACAG AGCTCCGAT CCGACCGCG GCGCGGCTC GCGCTTAA
 201 GCGCTGCTA GCAACA

M. parssia Length: 785

1 GTCCGCGCG CCGCGCGCG CACGCAATG TCAGCGACTT CCGCGCTT
 51 CCGCGCAAT CCGCGCGCA CCGCGCGCG CCGCGCAAT AGCTGCGCA
 101 CCGCGCAAT CCGCGCGCG CCGCGCAAT GATCAGCTC GCGCGCAAT
 151 CCGCGCAAT CCGCGCGCG CCGCGCAAT CCGCGCAAT AGCTGCGCA
 201 CCGCGCAAT CCGCGCGCG CCGCGCAAT CCGCGCAAT AGCTGCGCA
 251 CCGCGCAAT CCGCGCGCG CCGCGCAAT CCGCGCAAT AGCTGCGCA
 301 CCGCGCAAT CCGCGCGCG CCGCGCAAT CCGCGCAAT AGCTGCGCA
 351 CCGCGCAAT CCGCGCGCG CCGCGCAAT CCGCGCAAT AGCTGCGCA
 401 CCGCGCAAT CCGCGCGCG CCGCGCAAT CCGCGCAAT AGCTGCGCA
 451 CCGCGCAAT CCGCGCGCG CCGCGCAAT CCGCGCAAT AGCTGCGCA
 501 CCGCGCAAT CCGCGCGCG CCGCGCAAT CCGCGCAAT AGCTGCGCA
 551 CCGCGCAAT CCGCGCGCG CCGCGCAAT CCGCGCAAT AGCTGCGCA
 601 CCGCGCAAT CCGCGCGCG CCGCGCAAT CCGCGCAAT AGCTGCGCA
 651 CCGCGCAAT CCGCGCGCG CCGCGCAAT CCGCGCAAT AGCTGCGCA
 701 CCGCGCAAT CCGCGCGCG CCGCGCAAT CCGCGCAAT AGCTGCGCA
 751 CCGCGCAAT CCGCGCGCG CCGCGCAAT CCGCGCAAT AGCTGCGCA

M. malinvarum Length: 741

1 TCGTACCGG CTCTCCCTG GTTCACAGC CCGCGCAAT CCGCGCAAT
 51 TCGTACCGG CTCTCCCTG GTTCACAGC CCGCGCAAT CCGCGCAAT
 101 TCGTACCGG CTCTCCCTG GTTCACAGC CCGCGCAAT CCGCGCAAT
 151 TCGTACCGG CTCTCCCTG GTTCACAGC CCGCGCAAT CCGCGCAAT
 201 TCGTACCGG CTCTCCCTG GTTCACAGC CCGCGCAAT CCGCGCAAT
 251 TCGTACCGG CTCTCCCTG GTTCACAGC CCGCGCAAT CCGCGCAAT
 301 TCGTACCGG CTCTCCCTG GTTCACAGC CCGCGCAAT CCGCGCAAT
 351 TCGTACCGG CTCTCCCTG GTTCACAGC CCGCGCAAT CCGCGCAAT
 401 TCGTACCGG CTCTCCCTG GTTCACAGC CCGCGCAAT CCGCGCAAT
 451 TCGTACCGG CTCTCCCTG GTTCACAGC CCGCGCAAT CCGCGCAAT
 501 TCGTACCGG CTCTCCCTG GTTCACAGC CCGCGCAAT CCGCGCAAT
 551 TCGTACCGG CTCTCCCTG GTTCACAGC CCGCGCAAT CCGCGCAAT
 601 TCGTACCGG CTCTCCCTG GTTCACAGC CCGCGCAAT CCGCGCAAT

651 GAGGTGTTT TCAGAGCGG CGCCCTGGA AGTCAGGCT CCGCCGCA
 701 ATCCGGGCTC GCTGGGGTC TTGAGGCGC TCGAGCAAT A

M. simiae Length: 748 January 10, 2001 10:09 Type: M Check: 6957 ..
 U3, 04

1 TGTATGGG CTCTTCCTG GGTCCACAG GCCGCAZBG CTTCAGGTA
 51 CTCCGCGAGC AFGGTCCGCT GGCOCGCGG CCGCAGCTG TGTTCGCGA
 101 GTTCGTGGT GTTCAGCGG AACCCGCGC CCGACTGAC CGTTCGCGG
 151 GACAGAGGT CCGGGGTGC GATCTTTTC GCGAGCTGA TCGGTCTGT
 201 CTGAGGCGC AGCGCGAGG CGGTGACAG TCGACCGCG GACCTGACG
 251 CCGAGCGCG GCCAGACTG ACCGAGGCT CCGGCGTGG CATGTAGCG
 301 TCGTCGCGA GCGATTCTC GCTCTCTG GAGTGGCGG CTTCGCGCT
 351 GATCGGATG TGAGTGTGT CTGCGCTGA GAACCTTGT AGCCATGCT
 401 CCGCGCGAG TTGCGCGCG GCGCGCGG CGATCGCGG ATCACTGCT
 451 AAGAGCGCA GCCCTAATC CATCGCAGA ATTAGAGCT GTTCACTC
 501 TGTGAGCAA GCGCGCGCG CTACTCGAC CCGCAGCGG GCGCTGAGA
 551 GATTCGCTC TGTGCGCGC TACGCGCGG TCGCTCGCG CCGCGCTC
 601 GAGCTGCGC TAGCTGCTT GATCGTGG CCGTACGCA AGCGCGCGA
 651 CCGCTGCGC TACCGCGCG CCGAGCTG CAGACGCGC GTCGCTGCG
 701 AGCAGTACG TCGCGCGCG CAGCTCTG AAGCAGTGG AGCAGCA

M. simiae Length: 712

1 GTGCGCGCG GCGCGCGCG GACCGCTGA TCAGCGAGCT CGTCGTAAT
 51 CCGCGCGAG CCGCGCGCG GCGTACCGG CCGCGCGCG AGTCACTCA
 101 GCGTGGCAT GTTTTGGCG AGCTGATCG GATCATGCT GACCGCGAG
 151 GCGCGCGCG TCGCAGCGG GACCGCGAG GTCACCGCG CCGCGCGAG
 201 CAACTCAGC CAGCGTCCA GCGTGGCAT GAGCGCTCA TCGCGCGAG
 251 AGCGCTACT CCGTGGCGA TCGCGCGCT CCGCTGAT CCGGTGCTG
 301 GTGTCTCAG CCGCTGCGA CCGTCAAA CCGTCTCT CCGCGCTCT
 351 TCGCGCGCG GCGCGCGCG TCGCGCGAG CCGTGGAA AGTCACTCA
 401 CCGTCACTT CCGCGCGAG AGAGCTGCT CTACTCGCA TCGCGCGAG
 451 CCGCGCGCG CCGCGCGCG GCGCGCGCG CCGCGCGAG CCGCGCGAG
 501 CCGCGCGCG TCGCTGAGT CCGCGCGCG AAGCGCGCG GAGTCACTA
 551 CCGCGCGCG TCGCTGAGT CCGCGCGCG CCGCGCGAG CCGCGCGAG
 601 CCGCGCGCG CCGCTGAGT CCGCGCGCG TCGCTGAGT CCGCGCGAG
 651 AGCTTCTCT GTACTGAGT ATCGCGTGG CCGCGCGCG CCGCGCGCG
 701 TACTCGCGA GC

M. tuberculosis Length: 802

```

1  TCATAGCAGG CCTCCCTCTG GGTCCACAC GCCCGCATCG CCTCGAGGTA
51  TTCCGGCAGC ATGGTGGGGC GGGGTCCGGG TGGCAGACA TGATCGACGA
101 CCTCGTGGGT GTTCAGCCCG AACCGGACCC CGACGCTGAC CCGGCCGTGC
151 GACAAATGAT CCAGCGTCCG AATGCTTTTC GCGACGCTGA TCGGATCATG
201 CTGACCCGGC AGCGCCACCG CGGTGGCAG CGGATTCGGC GACGTACCGG
251 CCGATGCTGC TCCAGGCTTC ACCCAGGGT CCAAGCTCCG CATATAGCGG
301 TCGTCCGCA GCGAGCGTC ACCCGCTGT GGAAGGCGCG CCTGGCGCTT
351 GACCGGGATG TCGGTCTGTT CCGGCACGTA AACCTGCGA AACCGCTGCG
401 TTTCAGCAGG TCTGGGGGCT GCGGGGGGGG TGAATCCCGG GTCCCTGATG
451 AACAGCACAA GTCCGTATG CATGCAACGA ATTAGAACGT GTTCAGCTTG
501 CGCCGGGCAA GCGGCCGTCC AGTCTTAAAT GTCCGACCG CGGTCTGCTC
551 CCGCAGCGGC ACTCGAAGCT CGCTACCGT GGTTCATCGA ATCGCTCGCC
601 CCGCAGCACA GCTTCGCACT CGACCAATCG AGGAGCCATG ACCTACTCGC
651 CCGGTACCCG CGGATACCGG CAGGCGAGC CCCTAGGCTC CTAGCGAGGC
701 GTACACCCCT CGTTCGCCCA CGCGATGAG GTTCGACGCA AGCTACCGAT
751 GTACTTGAGC ATCGCGGTGG CAGTCTCGG CATTGCTCGG TACTTCGCGA
801 CC

```

M. bovis Length: 828

The underlined nucleotide is thought suspected to be used for differentiating *M. tuberculosis* from *M. bovis*.

```

1  TCATAGCAGG CCTCCCTCTG GGTCCACAC GCCCGCATCG CCTCGAGGTA
51  TTCCGGCAGC ATGGTGGGGC GGGGTCCGGG TGGCAGACA TGATCGACGA
101 CCTCGTGGGT GTTCAGCCCG AACCGGACCC CGACGCTGAC CCGGCCGTGC
151 GACAAATGAT CCAGCGTCCG AATGCTTTTC GCGACGCTGA TCGGATCATG
201 CTGACCCGGC AGCGCCACCG CGGTGGCAG CGGATTCGGC GACGTACCGG
251 CCGATGCTGC TCCAGGCTTC ACCCAGGGT CCAAGCTCCG CATATAGCGG
301 TCGTCCGCA GCGAGCGTC ACCCGCTGT GGAAGGCGCG CCTGGCGCTT
351 GACCGGGATG TCGGTCTGTT CCGGCACGTA AACCTGCGA AACCGCTGCG
401 TTTCAGCAGG TCTGGGGGCT GCGGGGGGGG TGAATCCCGG GTCCCTGATG
451 AACAGCACAA GTCCGTATG CATGCAACGA ATTAGAACGT GTTCAGCTTG
501 CGCCGGGCAA GCGGCCGTCC AGTCTTAAAT GTCCGACCG CGGTCTGCTC
551 CCGCAGCGGC ACCCGAAGCT CGCTACCGT GGTTCATCGA ATCGCTCGCC
601 CCGCAGCACA GCTTCGCACT CGACCAATG AGGAGCCATG ACCTACTCGC

```

M. *marugi* Length: 100

1 GTTCAACAC CGGAGCAG CGGCGCGGT AGAAGCTCG ATGACACGC
 51 AGTCGCCGC AGACCCCGC GGCAGGTGC GTAGCGTGG ATGTGTGAT
 101 CGGTCGCAA CGCTGCTCT GACAACTAC GCGTTATG GAGCGTCCA
 151 GCGACCTCG CGCGAGGCG GCGCGTGGG GTACACGCT CCGACACAG
 201 TGGCCGCCA AGGCGACGA TGCACAGAG AAGCAATAC GTACTGCGC
 251 GGTAGCGCG GATATCCAG CCGCAGTGC GCGGTTCTT AGCGCGGTC
 301 CCGACAGTC TTGCGCAAT CGATGACCG GCGACAGAG CTGACGCTT
 351 ATCTGACCT GCGGTGCGG GCGCTGCGC TGGCGCGTA CTTGCGAGT

M. *avium* Length: 681

The underlined nucleotide is thought suspected to be used for differentiating M. *avium* from M. *paratuberculosis*.

1 TCGTAGCTCG CTTCCTCTC GGTCCACAG CCGCGATCG CTTCAGGTA
 51 TTGCGCAGC ATGATCGGC GCGGCGCGC GCGCACGCG TGGTCGCGA
 101 GTTCGTGGT GTTCAGCGC AAGCGAGC CGAGGCTGAC CCGCGCGCG
 151 GACAGATGCT CAAGGCTGC AATATTTTC GCGAGGCTA TCGGTCGTG
 201 TTGACCGGC AGGCGACCG CGGTGACAG CCGCACCGC GAGGTGACG
 251 CACAGCGCG GCGTACACT ACCGACGCT CCGAGGTCG CATGTAGCG
 301 TCGTGGGCA GCGAGCGTC GCGGTCGTC GGTTCGCGG CTTGCGGCT
 351 GATCGGATA TCGGTGTGT CCGGCGCTA GAGGTCGCA AACCGTGGT
 401 GGTGCGCAG CTTCGCGGC GCGCGCGAG AGTTCGCGG GTGCGTGGT
 451 AAGAGCACA GCGCGTATC CATGACGTA ATTAGACGT GTTCATCTC
 501 TCGCGCGCA GCTTCGCTA GAGCGACGT CTGCGCGCG GTCGCTCTC
 551 GAGCGCGCG GCGAGCGCA TGGGACGCG AGCGCGGTC GCGGTGCGC
 601 TAGCGTGGT GATGACGCT GTGCGTCTC CAGTACGCG CTTCAGACA
 651 CCGCGTGGT TCGCACGCT GCGCGCGCT GCGCATATA AGCGATGCA
 701 AGCAACGGA GAGGCTATG CTTACTCTC GCGCGCGCT GATATCTAC
 751 CCGCGCGTC TCGCGCGCG TATGACGCG CCGACGCTC TTGCGCGAA
 801 GCGGCGCGC GCGAGCGCA ATCGCGCTC TACCTACAG TCGCGTGGT
 851 CCGCGTGGT TTGCGCGCT AGCGCGGAA ?

M. *paratuberculosis* Length: 707

1 TCGTAGCTCG CTTCCTCTC GGTCCACAG CCGCGATCG CTTCAGGTA
 51 TTGCGCAGC ATGATCGGC GCGGCGCGC GCGCACGCG TGGTCGCGA
 101 GTTCGTGGT GTTCAGCGC AAGCGAGC CGAGGCTGAC CCGCGCGCG
 151 GACAGATGCT CAAGGCTGC AATATTTTC GCGAGGCTA TCGGTCGTG
 201 TTGACCGGC AGGCGACCG CGGTGACAG CCGCACCGC GAGGTGACG
 251 CACAGCGCG GCGTACACT ACCGACGCT CCGAGGTCG CATGTAGCG

301 TCCTCGGCA GCGAGCGTC GCGGTGCTC GGTGCGCGG CTTCCGCTT
 351 CATCGGATA TCGGTCTTT CCGGACCGA GAGGTGCGA ACCCGCTCG
 401 CTTGCGGAG CTTCGCGGC GCGCGCGAG AGATGCGAG GTGCTGCTG
 451 AAAAGCACA GCCCTTATC CATCGAGTA ATTAGAGCT GTTCTACCT
 501 TCGCGGCGA GCTGTCTTA TCGGACCTT CTCGCGCGC GGTCTCTTC
 551 GAGCGCGCG GCGAGCGCA TCGGACGCG ACCGCGCGC GAGGTGCGC
 601 TCGGTGCGT CATCGAGCT GCGGTGCGG CAGTGCAGG CTTCTAGCA
 651 CCGGTGCGA TCGAGCTTT GCGCGCGCT CCGCTTAA AGCGAGTGA
 701 AGCACA

M. mullinsii Length: 686

1 TCGTGGCGG CTCTCTCTG CCGTCCAGT CCGCGCATC CCGTCCAGT
 51 ATTCTGCGA CATCTGCGG GCGGTGCGG GTGAGCGGC ATGCTGCGG
 101 AGTTCGTGG TGTTCGAGC GAGCGCGAG CCGAGCGTA CCGTCCGCG
 151 GCGAGAGTA TCGAGCTGG CATGCTCTT GCGCGGCTG ATGCGGTCT
 201 GCTTCAGCG CAGCGCGAG CAGTTCGAG GCGTACCGC CAGGTTCAG
 251 CCGGTGCGG CCGCTTACT CAGCGCGG TCGAGCTGC GCGAGTACG
 301 ATCTGCGGA AGCGAGGAT GCGCGCTCT TCGTGCAGG GTTCTCTCT
 351 TGAATGGAT ATGCTCTTC TCGGAGCTT AGAGGTGTC AAGCGCTCG
 401 TCGTCCGCA GTTTCGCGC CCGCGCGGA GCGTCCGCG GGTCTCTCT
 451 GAGAGCGCA AGCGTATAT CATAGAGTA ATTAGAGCT GTTCTACCT
 501 GCGCGCGCA GCGCGCGCG CCGCATCGG CTCGCGCGA TCGCGGAGG
 551 TGAATGGCT GGTTCAGCG GCGAGCTGC CCGCGCGCG AGCAGCGGA
 601 CCGCGCGTG CCGGTCTCT CAGTTCGCT CCGAGGAGC AAGCGTCCA
 651 ATCGAGGAG GCGCGCGGA CCGCGCGCA TACCA

M. mullinsii Length: 683

Underlined : sequence variation within several strains of *M. mullinsii*.
 Nucleotides as disclosed are those which are the most frequently found

1 TCGTGGCGG CTCTCTCTG CCGTCCAGG CCGCGCATC CCGTCCAGT
 51 ATTCTGCGA CATCTGCGG GCGGTGCGG GTGAGCGGC ATGCTGCGG
 101 AGTTCGTGG TGTTCGAGC GAGCGCGAG CCGAGCGTA CCGTCCGCG
 151 GCGAGAGTA TCGAGCTGG CATGCTCTT GCGCGGCTG ATGCGGTCT
 201 GCTTCAGCG CAGCGCGAG CAGTTCGAG GCGTACCGC CAGGTTCAG
 251 CCGGTGCGG CCGCTTACT CAGCGCGG TCGAGCTGC GCGAGTACG
 301 ATCTGCGGA AGCGAGGAT GCGCGCTCT TCGTGCAGG GTTCTCTCT
 351 TGAATGGAT ATGCTCTTC TCGGAGCTT AGAGGTGTC AAGCGCTCG
 401 TCGTCCGCA GTTTCGCGC CCGCGCGGA GCGTCCGCG GGTCTCTCT
 451 GAGAGCGCA AGCGTATAT CATAGAGTA ATTAGAGCT GTTCTACCT
 501 GCGCGCGCA GCGCGCGCG CCGCATCGG CTCGCGCGA TCGCGGAGG
 551 TGAATGGCT GGTTCAGCG GCGAGCTGC CCGCGCGCG AGCAGCGGA
 601 CCGCGCGTG CCGGTCTCT CAGTTCGCT CCGAGGAGC AAGCGTCCA
 651 ATCGAGGAG GCGCGCGGA CCGCGCGCA TACCA

501 GCGGGGCAAG GCGGCGGCG GCGAATGCG TTGCGCGAT GCGCGGAT
 551 GATGCGGCTG GTGCGCGCG GCGCGGCG GCGGCGGCA GCGCGGAC
 601 GTGCGTATG GTGCTGTTC GATCGGCTC GCGCGGCGA AGCGCGCA
 651 TGCGCGCG GCGCGGCG GTGCGCGA TACA

M. leprose Length: 729

1 TCAATACAG GCTTCTCTT TGTGTCATA ATGCTGCTT TCTGTGAG
 51 CATTCGTACA CAGTGGTGG GCGCGGCG GATCGGCA? CAGTGTCT
 101 GAGCTGCTT GTCTTCCAG CAGCGCGAG GCGGAGTTC ACTGACTGCG
 151 CCGCAATTT ATCGAGTTC ACAATACTTT TCGGAGTGT GATGCGTCA
 201 TGTAGAGCG GCGCGGCG CAGCGGAG AGTGTAGCG TCGGAGTCA
 251 AGCGGAGT CCGCGGCG CTTAGCGAG AGTGTAGCG AGCGAGTCA
 301 TATGCTGTC GTCTGCGAG AGTGTAGT AGTGTAGT AGTGTAGT
 351 GTCTGAGT CAGTGTCTT TGTGTGTTC GCGCGGCG GATGCGTCA
 401 AGCGGAGT TCTGCGAG CTTAGCTCT GCGCGGCG TGTGCGCG
 451 GTGTGTGT AAGCGGCG TCGGAGCG CAGTGTAG AGTGTAGCG
 501 TGTGTGCT GCGCGGCG AGCGGAGT CAGTGTAG AGTGTAGCG
 551 CCGTGTAG CAGTGTAG CAGTGTAG CCGCGGCG TCGCGGAG
 601 GTGCGTATG GTCTGTCTT GATGTGTCT CAGTGTAG AGTGTAGT
 651 TGCGGCTTA TCGAGGCTG CAGTGTAG CAGTGTAG CAGTGTAG
 701 GTGCGGCT GCGCGGCT GATGTAGT

Sequence #57 *M. paratuberculosis**M. paratuberculosis* (57) Length: 618

1 GATTCAGAG AGTGTGCT GCGCGGCG AGTGTGCT GATGTAGT
 51 TGTAGCGAT GTGTGTCT CAGCGGCG CAGTGTCT TGTAGTCT
 101 AGCTGAGAT TGTGAGTCT CTTAGTCT GCGTGTAGT GTGTGTCT
 151 CAGCGGCG AGTGTGCT TGTGTCTT GTGTGTCT AATGCGCG
 201 CTAGAGTCT GTGTGTCT CAGTGTCT GCGTGTCT GTGTGTCT
 251 TACAGGCT GCGGAGAG CAGTGTCT CAGTGTCT GCGTGTCT
 301 GTGTGTCT GCGGAGAG GTGTGTCT AGTGTGCT AGTGTGCT
 351 GAGTGTCT TGTGTCTCT CTGTGTCT CAGTGTCT AATGAGTCT
 401 TGTGTCTCT TGTGTCTCT CAGTGTCT AGTGTGCT GCGTGTCT
 451 CAGTGTCT TGTGTCTCT CAGTGTCT AGTGTGCT GCGTGTCT
 501 GATGTGCT CAGTGTCT AGTGTGCT GTGTGTCT GTGTGTCT
 551 AGTGTGCT GTGTGTCT CAGTGTCT TGTGTCTCT GATGTGCT
 601 GATGTGCT CAGTGTCT

Unvalidated sequences

M. smegmatis Length: 219

1 GTTCTACTC CAGTGTCT GTGTGTCT CAGTGTCT GATGTGCT
 51 CAGTGTCT CAGTGTCT CAGTGTCT AGTGTGCT GATGTGCT
 101 TGTGTCTCT CAGTGTCT CAGTGTCT CAGTGTCT GATGTGCT
 151 CAGTGTCT CAGTGTCT CAGTGTCT CAGTGTCT GATGTGCT
 201 CAGTGTCT CAGTGTCT

M. mageritensis Length: 129

1 GTTCTACTC CAGTGTCT GCGGAGTCT GTGTGTCT GTGTGTCT
 51 AGTGTGCT CAGTGTCT CAGTGTCT GATGTGCT GATGTGCT
 101 CAGTGTCT CAGTGTCT CAGTGTCT

M. tuberculosis Length: 116

1 GTTCTACTC GTGTGTCT GCGGAGTCT AGTGTGCT CAGTGTCT
 51 CAGTGTCT CAGTGTCT GTGTGTCT GTGTGTCT CAGTGTCT
 101 CAGTGTCT AATGCT

Figure 4. U1-U4 consensus amplification of *us-p34* regions of different mycobacterial species

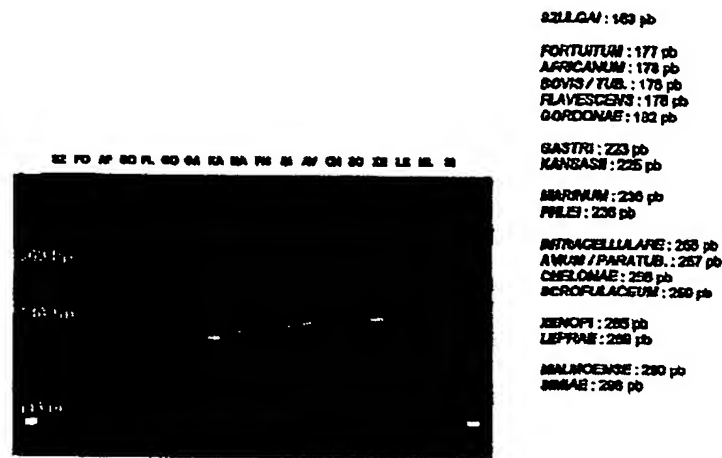
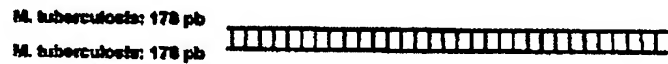
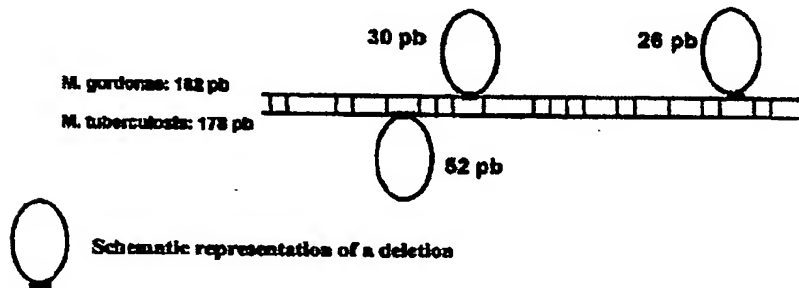


Figure 5. Specific and on specific hybridization

Homologous hybridization between both 178-bp amplicons from *M. tuberculosis*



Deletion within each of both single strands hampers hybridization between the 182-bp amplicon from *M. gordonae* and the 178-bp amplicon from *M. tuberculosis*



Schematic representation of a deletion

Figure 6. Differential reverse hybridization of mycobacteria target amplicons on a nylon membrane disclosing species-specific mycobacteria probes.

a) Unlabeled amplified DNA segments specific for various mycobacteria species were first transferred on nylon membrane (*M. tuberculosis* (TB), *M. avium* (AV), *M. szulgai* (SZ), *M. kansasii* (KA), *M. xenopi* (XE), *M. simiae* (SI) and *M. mageritensis* (ML)).
b) Digoxigenin-labeled amplicons from *M. tuberculosis* (TB*), *M. avium* (AV*), *M. szulgai* (SZ*), *M. kansasii* (KA*), *M. xenopi* (XE*) and *M. simiae* (SI*) were hybridized on the nylon membrane. Specific differential hybridization is obtained.

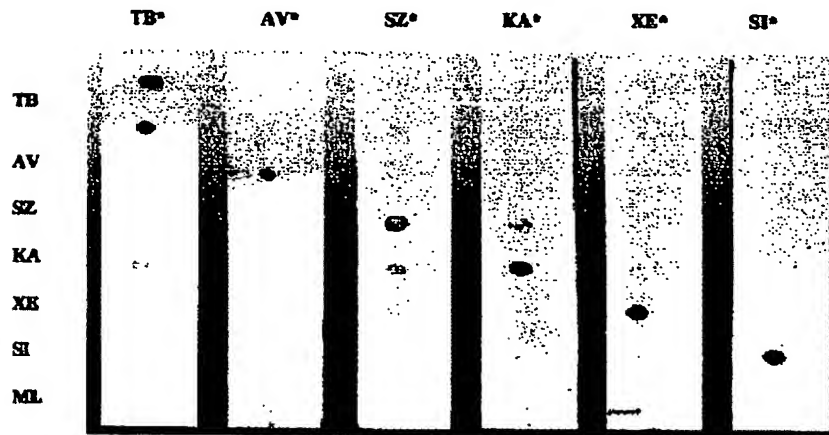


Figure 7. Example of biochips detecting specifically *M. gordonae*.

Control of fixation

Control of hybridization



[illegible][illegible][illegible][illegible]

	481						540
(mycV21)	-atgcagtgca	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctgcggggca	agctgctctg	atcagcaacg	
(mycP22)	-atgcagtgca	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctgcggggca	agctgctctg	atcagcaacg	
(mycP23)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	cgctggtgca	agcagctgct	ccgcagcaga	
(mycS12)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctcttagaga	agcggggccc	gtatctctga	
(mycP24)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	cgccggggca	agcggggccc		
(mycM25)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	cgccggggca	agcggggccc		
(mycP26)	-at.caacgca	a.cttagaacg	tggtctcaact	cgccggggca	agcggggccc	cgccaaatcg	
(mycV12)	-at.caacgca	a.cttagaacg	tggtctcaact	cgccggggca	agcggggccc	cgccaaatcg	
(mycG15)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	cgccggggca	agcgggttat	ctgcaga..	
(mycG16)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	cgccggggca	agcgggttat	ccgcgagtcg	
(mycG01)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS12)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS13)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS14)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS15)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS16)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS17)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS18)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS19)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS20)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS21)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS22)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS23)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS24)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS25)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS26)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS27)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS28)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS29)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS30)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS31)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS32)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS33)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS34)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS35)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS36)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS37)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS38)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS39)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS40)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS41)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS42)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS43)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS44)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS45)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS46)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS47)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS48)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS49)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS50)	-atgcagtcga	a.cttagaacg	tggtctcaact	ctctggccc..		
(mycS51)	-atgcagtcga	a.cttagaacg</					

```

541                                     600
[mycV121] tcttcgcgcgc ..... cgcctgcctc cgcagacccc cgcgcacagcc aatgcgcgcg
[mycV122] tcttcgcgcgc ..... cgcctgcctc cgcagacccc cgcgcacagcc aatgcgcgcg
[mycV123] tcttcgcgcgc gaccacacac acgtgcgcgc gcgcgcgcgc cgcgcacagcc cgcgcgcgcg
[mycV124] cccgcgcgcgc gcgcgcgcgc ac_gatcgcgc cctgcgcgcgc cctgcgcgcgc cgcgcgcgcgc
[mycT821] ..... gctcacg tgcgttaatgc cgcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc
[mycB022] ..... gctcacg tgcgttaatgc cgcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc
[mycD122] gctgcgcgcgc atc.....gac gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc acgcgcgcgc gcgcgcgcgc
[mycD123] gctgcgcgcgc atc.....gac gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc acgcgcgcgc gcgcgcgcgc
[mycA125] tgcgcgcgcgc ..... tgcgcgcgc gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc
[mycA131] tgcgcgcgcgc ..... tgcgcgcgc gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc
[mycA132] ..... ca ..... gcgcgcgc gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc
[mycB131] ..... ga ..... gcgcgcgc gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc
[mycB132] cgcgcgcgc ..... atgcgcgc gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc
[mycV142] ctcgcgcgcgc ..... ggcgcgcgc gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc
[mycV141] ..... gta gacgcgcgcgc tgcgcgcgcgc gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc
Copies=1

```

```

601
(myrcA1721) gcaacgcygca tgcagcagtcgc gctagctcggg gtagctacacn ggtctgc...
(myrcA722) gcaacgcygcyg tgcagcagtcgc gctagctcggg gtagctacacn ggtctgc...
(myrcA128) gcaacgcygcyg tgcagcagtcgc gctagctcggg gtagctacacn ggtctgc...
(myrcA128) ggcacacccgc tgcagcagtcgc gctagctcggg ttagctacacn ggc.ctaac gcaacgcyg
(myrcA721) gcaacgcygca cgcagcagtcgc gctagctcggg ttagctacacn ggtctgc...
(myrcA022) gcaacgcygca cgcagcagtcgc gctagctcggg ttagctacacn ggtctgc...
(myrcA022) ggcgcgcgcgc cgcagcagtcgc gctagctcggg ttagctacacn ggtctgc...
(myrcA122) ggcgcgcgcgc cgcagcagtcgc gctagctcggg ttagctacacn ggtctgc...
(myrcA633) ggcgcgcgcgc cgcagcagtcgc gctagctcggg ttagctacacn ggtctgc...
(myrcA633) ggcgcgcgcgc cgcagcagtcgc gctagctcggg ttagctacacn ggtctgc...
(myrcA031) ggcgcgcgcgc cgcagcagtcgc gctagctcggg ttagctacacn ggtctgc...
(myrcA531) ggcgcgcgcgc cgcagcagtcgc gctagctcggg ttagctacacn ggtctgc...
(myrcA125) ggcgcgcgcgc cgcagcagtcgc gctagctcggg ttagctacacn ggtctgc...
(myrcA742) ggcgcgcgcgc cgcagcagtcgc gctagctcggg ttagctacacn ggtctgc...
(myrcA41) cttagcgttgc tgcgttgagtc gctgcgcac gctgcgcgc acacgttcgc gctgatatg
660

```

```

561
[mycA721] ..... ..tgcgcgc agtcgcgcgc ctcgcagcac cgcctgcgat cgcac....
[mycPT22] ..... ..tgcgcgc agtcgcgcgc ctcgcagcac cgcctgcgat cgcac....
[mycE22] gaaggtgttt tcaaaaggcg cgcg....c ctcgcagcac agcctgcgat cgcacaaagt
[mycE12] gcacgccttc gctcaccgcg cggcgcgacgc ctcgcagcac ggcctgcgat tgcagaaagt
[mycE62] ..... ..atcgtctcg ctcgcagcac agcctgcgat tgcacaaagt
[mycB028] ..... ..atcgtctcg ctcgcagcac agcctgcgat tgcacaaagt
[mycA928] ..... ..atcgtctcg cagggaccaa agcctgcgat tgcacaaagt
[mycU12] ..... ..atcgtctcg cagggaccaa agcctgcgat tgcacaaagt
[mycG638] ..... ..atcgtctcg cagggaccaa agcctgcgat tgcacaaagt
[mycG631] ..... ..atcgtctcg cagggaccaa agcctgcgat tgcacaaagt
[mycE31] ..... ..atcgtctcg cagggaccaa agcctgcgat tgcacaaagt
[mycE38] ..... ..atcgtctcg cagggaccaa agcctgcgat tgcacaaagt
[mycE28] cca..attggc gctgtttacc aacggtgcgc atgggcagca agcctgcgat tgcacaaagt
[mycE48] ..... ..cg acgcctgcgc aatgcgtgcg cgcctctgca agcctgcgat tgcacaaagt
[mycX41] Agcgtctcac gcacgcctgc cgcgcagcgc cgcctctgca atcagcgcgc gcacacacgt
Consensus

```

[illegible]

	701
{nycAV21}	-
{nycPT25}	-
{nycSL22}	-
{nycSL25}	-
{nycTBQ1}	-
{nycTQ21}	-
{nycUL21}	-
{nycUL21}	-
{nycGA31}	-
{nycKA31}	-
{nycGQ31}	-
{nycSL31}	-
{nycSL22}	-
{nycTB41}	-
{nycTK41}	-
Consensus	C

Abstract

The present invention relates to a method for detecting non-tuberculosis *Mycobacterium* strains (NTM) in a sample, comprising:

- 5 (i) providing a non-tuberculosis *Mycobacterium* species-specific upstream p34 gene region (us-p34) nucleotide probe,
- (ii) reacting said us-p34 nucleotide probe with said sample under conditions that allow for the selective formation of nucleotide duplexes between said us-p34 nucleotide probe and a corresponding non-tuberculosis *Mycobacterium* nucleic acid target present in
- 10 said sample, and,
- (iii) detecting any nucleotide duplexes containing said us-p34 nucleotide probe.

The present invention also relates to a method for detecting non-tuberculosis *Mycobacterium* strains in a sample, comprising:

- 15 (i) providing at least two distinct non-tuberculosis *Mycobacterium* species-specific us-p34 primers,
- (ii) reacting said us-p34 primers with said sample under conditions that allow for the selective amplification of an us-p34 sequence in a non-tuberculosis *Mycobacterium* nucleic acid present in said sample, and,
- (v) detecting the amplified product of step (ii).

- 20 The present invention further relates to new us-p34 sequences as well as probes and primers derived therefrom useful for the detection of mycobacteria, as well as methods and diagnostic kits based on the same.